

**Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro Tecnológico  
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química**

**Copolímeros de 3-Hidroxibutirato-*co*-3-Hidroxivalerato  
(PHBV) produzidos por *Chromobacterium violaceum***

**Claudimir Antonio Carminatti**

Florianópolis, SC - Brasil  
Outubro 2008



**Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro Tecnológico  
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química**

**Copolímeros de 3-Hidroxi-butirato-co-3-Hidroxi-valerato  
(PHBV) produzidos por *Chromobacterium violaceum***

**Claudimir Antonio Carminatti**

**Prof. Dr. Luismar Marques Porto – Orientador**

**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Regina Vasconcellos Antônio – Co-Orientador**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a  
obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

Florianópolis, SC - Brasil  
Outubro 2008



# **Copolímeros de 3-Hidroxitirato-co-3-Hidroxiclerato (PHBV) produzidos por *Chromobacterium violaceum***

Tese julgada para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração de Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos e aprovada pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

por

**Claudimir Antonio Carminatti**

**Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques Porto (EQA-UFSC)**

**Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Vasconcellos Antônio (BQA-UFSC)**

Banca Examinadora

**Prof. Dr. Luismar Marques Porto (EQA-UFSC) – Orientador**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cíntia Soares (EQA-UFSC) – Membro Interno**

**Prof. Dr. Carlos R. Rambo (PGMAT-UFSC) – Membro Interno**

**Prof. Dr. André Oliveira S. Lima (UNIVALI) – Membro Externo**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa L. S. Schneider (UNIVILLE) – Membro Externo**

Florianópolis, 21 de outubro de 2008



Este trabalho é parte integrante das pesquisas realizadas pelo Grupo de Engenharia Genômica e foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLAB) junto ao Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos (LBBMM) junto ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina.





## AGRADECIMENTOS

---

*Primeiramente agradeço a Deus pela vida...*

*Aos professores Luismar Marques Porto e Regina Vasconcellos Antônio, pela orientação, compreensão e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho;*

*Aos membros da banca pelas valiosas contribuições;*

*Aos colegas do InteLAB, LBBMM e Engebio, em especial Derce, Itamar, Ana Kelly, André, Jaciane e Ricardo, pela amizade e ensinamentos compartilhados;*

*Aos professores, coordenação e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFSC, em especial ao Edevilson, por todo o auxílio prestado;*

*A minha amada Célia, aos meus pais e familiares, pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos desta jornada;*

*E a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.*



## RESUMO

---

Este trabalho teve por objetivo a obtenção de poli-hidroxicanoatos (PHAs) biossintetizados por *Chromobacterium violaceum*, em diferentes condições de escala, concentração e variação de substrato, nutrientes limitantes e pH. Embora a produção de PHAs por *C. violaceum* tenha sido um dos motivos pelos quais este microrganismo tenha tido seu genoma completamente sequenciado por um consórcio envolvendo grupos de pesquisa de todo o país, não se tem conhecimento de nenhum estudo sistemático da produção desses poliésteres em escalas de laboratório e de bancada. As propriedades dos biopolímeros produzidos são consequência da sua composição molecular, que pode ser influenciada pelas condições de operação, assim como do(s) substrato(s) utilizado(s). Em particular, o grau de copolimerização é um parâmetro que pode interferir diretamente no tipo de aplicação do PHA produzido. Como a *C. violaceum* é capaz de produzir o homopolímero de poli-hidroxivalerato (PHV) e copolímeros PHBV, que incorporam unidades de 3-hidroxibutirato (3HB), isto é, P(3HB-co-3HV), este estudo concentrou seus esforços na obtenção de diferentes graus de incorporação de unidades de valerato no copolímero, visando características desejáveis para novas aplicações comerciais. Foram estudados os copolímeros de 3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV) produzidos por *C. violaceum* em agitador orbital de laboratório e biorreator de 4 litros, a 30°C sob limitação de nitrogênio ou de fósforo, utilizando diferentes pH (6 e 7), concentrações de glicose (10, 20 e 30 g·l<sup>-1</sup>) e concentração de propionato (0 e 10 mM). Os resultados demonstraram que a concentração de substrato, o pH e a adição de propionato afetam a quantidade total dos PHAs produzidos. Um acúmulo de 70% (g·g<sup>-1</sup>) foi obtido sob limitação de nitrogênio em agitador orbital a pH 7, 10 g·l<sup>-1</sup> de glicose e sem adição de propionato. A adição de 10 mM de propionato aumentou a incorporação de unidades de valerato, mas diminuiu a quantidade de biomassa produzida. O controle do pH e da aeração nas condições de cultivo utilizando o biorreator aumentou a quantidade de biomassa formada, alcançando um máximo de 6,54 g·l<sup>-1</sup> sob limitação de fósforo, em pH 7, 20 g·l<sup>-1</sup> de glicose, sem a adição de propionato. A adição de 10 mM de propionato às culturas realizadas em biorreator, contudo, não aumentou a

incorporação de 3HV ao copolímero obtido, sugerindo que o controle do pH tem influência sobre a composição do PHBV acumulado. A caracterização dos polímeros extraídos dos cultivos em biorreator demonstrou que a incorporação de unidades de valerato ao polímero diminuiu a temperatura de fusão do material em relação ao PHB puro, ficando entre 174 e 178°C. A temperatura máxima de degradação do polímero também foi influenciada pelo percentual de unidades de valerato, ficando entre 302 e 312°C, cerca de 30°C acima da temperatura de degradação do PHB puro (278°C). A pureza dos copolímeros extraídos foi superior a 95%. As características físico-químicas analisadas destes biopolímeros (temperaturas de fusão, transição vítrea, degradação inicial, degradação total, grupos funcionais, incorporação de violaceína no biopolímero, diâmetro de poros das membranas formadas) sugerem que esses materiais podem ser utilizados para o desenvolvimento de novas aplicações nas áreas biotecnológica e biomédica como, por exemplo, na produção de novos arcabouços de engenharia de tecidos.

Palavras-chave: *Chromobacterium violaceum*, biorreator, biopolímeros, poli-hidroxicanoatos, PHAs, copolímero de poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato).

## ABSTRACT

---

This work investigated the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesized by *Chromobacterium violaceum* in different conditions of scale, substrate variation and concentration, limiting nutrients and pH. Although the production of PHA by *C. violaceum* was one of the reasons why this microorganism has been completely sequenced by a consortium of Brazilian research groups located around the country, so far there has been no report of a systematic study involving the production of those polyesters in laboratory and bench scale. The properties of the biopolymers produced are a consequence of their molecular composition, which may be influenced by the operating conditions, as well as the substrate(s) used. In particular, the degree of copolymerization is a parameter that may directly interfere in the type of application of the PHA produced. Since *C. violaceum* is capable of producing the homopolymer of polyhydroxyvalerate (PHV), and the copolymer PHBV, that incorporates units of 3-hydroxybutyrate (3HB), that is, P(3HB-co-3HV), this study focused on the degree of incorporation of valerate units in the co-polymer, aiming new commercial applications. Copolymers of 3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (PHBV) were produced by *C. violaceum* in shakers and in a 4-liter bioreactor, at 30°C, under nitrogen or phosphorous limitation, using different pH (6 and 7), concentration of glucose (10, 20 and 30 g·l<sup>-1</sup>) and propionate (0 and 10 mM). Results showed that substrate concentration, pH and addition of propionate affect the total amount of PHA produced. A 70 wt% accumulation was obtained under nitrogen limitation in the shaker culture at pH 7, 10 g·l<sup>-1</sup> glucose, without addition of propionate. The use of 10 mM propionate improved the incorporation of valerate units, but decreased the amount of biomass. The control of pH and aeration in the bioreactor culture increased the amount of biomass, reaching a maximum of 6.54 g·l<sup>-1</sup> under phosphorous limitation, pH 7, and 20 g·l<sup>-1</sup> glucose, without the addition of propionate. However, the addition of 10 mM of propionate in the bioreactor culture did not increase the incorporation of 3HV units in the copolymer, suggesting that pH levels is an important parameter influencing the composition of the PHBV. Characterization of the extracted polymers from the bioreactor culture showed that the

incorporation of valerate units decreased the melting temperature with respect to pure PHB used as control. Values of 174 and 178°C were found. The maximum temperature of polymer degradation was also influenced by the percentage of valerate units, found between 302 and 312°C, 30°C above the pure PHB degradation temperature (278°C). Copolymers extracted were 95% pure. Physico-chemical properties of the those biopolymers (melting point, glass transition temperature, temperature of initial and total degradation, functional groups, incorporation of violacein, pore diameter of produced membranes) suggest that these materials might be useful for the development of new applications in the biotechnological and biomedical fields, such as –for instance– in the production of new scaffolds for tissue engineering products.

Keywords: *Chromobacterium violaceum*, bioreactor, biopolymers, polyhydroxyalkanoates, PHAs, copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate).

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 - Organização dos genes de biossíntese do triptofano em <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472 .....	33
Figura 2 - Estruturas modeladas por homologia para as subunidades (a) TrpE e (b) PabA de <i>Chromobacterium violaceum</i> .....	34
Figura 3 - Culturas estática (a) e agitada (b) realizadas com <i>Chromobacterium violaceum</i> em meio LB. (c) Coleta com seis dias de cultivo e precipitação do meio com etanol . .....	34
Figura 4 - Grânulos de poli-hidroxialcanoatos (PHAs) acumulados em <i>Pseudomonas putidas</i> . .....	35
Figura 5 - (a) Fórmula geral dos poli-hidroxialcanoatos (PHAs) (b) Exemplos de monômeros estruturais dos PHAs (c) Fórmula geral do copolímero poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato).....	38
Figura 6 - Biossíntese de poli-hidroxialcanoatos no contexto do metabolismo microbiano .....	49
Figura 7 - Biossíntese de poli-hidroxi butirato (PHB) em <i>Cupriavidus necator</i> .....	50
Figura 8 - Esquema da via de biossíntese de PHB e de PHBV a partir de glicose e propionato .....	51
Figura 9 - Modelo proposto para a poli-hidroxialcanoato sintase (PhaC) de <i>Chromobacterium violaceum</i> .. .....	53
Figura 10 - Organização estrutural dos grânulos e moléculas envolvidas na biossíntese e no catabolismo de poli-hidroxialcanoatos. 54	
Figura 11 - Biorreator de bancada BioFlo 110, com volume de trabalho de quatro litros e controle de temperatura, pH e agitação. ....	61
Figura 12 - Cinética da produção de biomassa (♦), consumo de substrato (▲) e de nitrogênio (■) para o cultivo de <i>Chromobacterium violaceum</i> a 30°C, pH 7 e 20 g·l <sup>-1</sup> de glicose sob limitação de nitrogênio, sem adição de propionato. ....	84
Figura 13 - Cinética da produção de biomassa (♦), consumo de substrato (▲) e de nitrogênio (■) para o cultivo de <i>Chromobacterium violaceum</i> a 30°C, pH 7 e 20 g·l <sup>-1</sup> de glicose sob limitação de nitrogênio, com a adição de 10 mM de propionato .. .....	84

Figura 14 - Cinética da produção de biomassa (◆), consumo de substrato (▲) e de fósforo (■) para o cultivo de <i>Chromobacterium violaceum</i> a 30°C, pH 7 e 20 g·l <sup>-1</sup> de glicose sob limitação de fósforo, sem adição de propionato.....	87
Figura 15 - Cinética da produção de biomassa (◆), consumo de substrato (▲) e de fósforo (■) para o cultivo de <i>Chromobacterium violaceum</i> a 30°C, pH 7 e 20 g·l <sup>-1</sup> de glicose sob limitação de fósforo, com a adição de 10 mM de propionato .....	87
Figura 16 - Produção de poli-hidroxicanoatos em <i>Chromobacterium violaceum</i> utilizando biorreator de bancada.....	91
Figura 17 - Extração dos poli-hidroxicanoatos produzidos por <i>Chromobacterium violaceum</i> da biomassa produzida em biorreator ...	91
Figura 18 - Material seco obtido da extração da biomassa produzida em biorreator por <i>Chromobacterium violaceum</i> .....	92
Figura 19 - Micrografias de MEV da superfície do filme de PHAs de <i>Chromobacterium violaceum</i> obtido em biorreator sob limitação de nitrogênio, pH 7, 30°C e 20 g·l <sup>-1</sup> de glicose. (a) 400X. (b) 4000X.....	92
Figura 20 - Micrografias de MEV da superfície do filme de PHAs de <i>Cupriavidus necator</i> obtido em biorreator sob limitação de nitrogênio, pH 7, 30°C e 20 g·l <sup>-1</sup> de glicose. (a) 400X. (b) 4000X.....	93
Figura 21 - Espectro de FTIR para o poli-hidroxitirato (PHB) obtido a partir de <i>Cupriavidus necator</i> .....	94
Figura 23 - Espectro de FTIR para o polímero sintetizado por <i>C. violaceum</i> em biorreator sob limitação de nitrogênio a 30°C, pH 7, 20 g·l <sup>-1</sup> de glicose, com adição de 10 mM de propionato.....	95
Figura 22 - Espectro de FTIR para o polímero sintetizado por <i>C. violaceum</i> em biorreator sob limitação de nitrogênio a 30°C, pH 7, 20 g·l <sup>-1</sup> de glicose, sem adição de propionato. ....	95
Figura 24 - Espectro de FTIR para o polímero sintetizado por <i>C. violaceum</i> em biorreator sob limitação de fósforo a 30°C, pH 7, 20 g·l <sup>-1</sup> de glicose, sem adição de propionato. ....	96
Figura 25 - Espectro de FTIR para o polímero sintetizado por <i>C. violaceum</i> em biorreator sob limitação de fósforo a 30°C, pH 7, 20 g·l <sup>-1</sup> de glicose, com adição de 10 mM de propionato.....	96
Figura 26 - Curva de DSC para o primeiro aquecimento do polímero sintetizado por <i>C. violaceum</i> sob limitação de nitrogênio a 30°C, pH 7, 20 g·l <sup>-1</sup> de glicose, sem adição de propionato (detalhe evidenciando T <sub>g</sub> ). ....	98



Figura 27 - Curva de DSC para o primeiro aquecimento do polímero sintetizado por <i>C. violaceum</i> sob limitação de nitrogênio a 30°C, pH 7, 20 g·l <sup>-1</sup> de glicose, com adição de 10 mM de propionato (detalhe evidenciando T <sub>g</sub> ). .....	99
Figura 28 - Curva de DSC para o primeiro aquecimento do polímero sintetizado por <i>C. violaceum</i> sob limitação de fósforo a 30°C, pH 7, 20 g·l <sup>-1</sup> de glicose, sem adição de propionato (detalhe evidenciando T <sub>g</sub> ). .....	99
Figura 29 - Curva de DSC para o primeiro aquecimento do polímero sintetizado por <i>C. violaceum</i> sob limitação de fósforo a 30°C, pH 7, 20 g·l <sup>-1</sup> de glicose, com adição de 10 mL de propionato (detalhe evidenciando T <sub>g</sub> ). .....	100
Figura 30 - Curva termogravimétrica do polímero sintetizado por <i>C. violaceum</i> sob limitação de nitrogênio a 30°C, pH 7, 20 g·l <sup>-1</sup> de glicose, sem adição de propionato. ....	102
Figura 31 - Curva termogravimétrica do polímero sintetizado por <i>C. violaceum</i> sob limitação de nitrogênio a 30°C, pH 7, 20 g·l <sup>-1</sup> de glicose, com adição de 10 mM de propionato. ....	103
Figura 32 - Curva termogravimétrica do polímero sintetizado por <i>C. violaceum</i> sob limitação de fósforo a 30°C, pH 7, 20 g·l <sup>-1</sup> de glicose, sem adição de propionato. ....	103
Figura 33 - Curva termogravimétrica do polímero sintetizado por <i>C. violaceum</i> sob limitação de fósforo a 30°C, pH 7, 20 g·l <sup>-1</sup> de glicose, com adição de 10 mM de propionato. ....	104
Figura 34 - Curva típica padrão para determinação da concentração de PHB. ....	125
Figura 35 - Curva típica padrão para determinação da concentração de PHV. ....	125
Figura 36 - Curva típica padrão para determinação da concentração de substrato. ....	126
Figura 37 - Curva típica padrão para determinação da concentração de nitrogênio. ....	126
Figura 38 - Exemplo de cromatograma obtido da análise de CG para o polímero sintetizado por <i>Chromobacterium violaceum</i> em biorreator. ....	127



## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 - Breve histórico dos poli-hidroxicanoatos.....	36
Tabela 2 - Classificação dos PHAs de acordo com diferentes critérios.....	39
Tabela 3 - Propriedades físicas de alguns poli-hidroxicanoatos e do polipropileno. ....	42
Tabela 4 - Produção de poli-hidroxicanoatos por diversas bactérias..	44
Tabela 5 - Substratos utilizados na produção de poliésteres por <i>Cupriavidus necator</i> .....	46
Tabela 6 - Aplicações potenciais dos PHAs na medicina. ....	56
Tabela 7 - Composição do meio mineral utilizado nos experimentos em agitador orbital e biorreator de bancada. ....	60
Tabela 8 - Composição da solução concentrada de elementos traço utilizada nos experimentos em agitador orbital e biorreator de bancada.....	60
Tabela 9 - Condições utilizadas nos experimentos em biorreator de bancada para produção de PHAs em <i>Chromobacterium violaceum</i> com pH 7 e concentração de glicose de 20 g·l <sup>-1</sup> . ....	62
Tabela 10 - Quantidade de reagente utilizado para análise de nitrogênio. ....	65
Tabela 11 - Quantidade de reagente utilizado para análise de fósforo..	66
Tabela 12 - Valores do pH final e da biomassa obtidos no cultivo de <i>Chromobacterium violaceum</i> sob limitação de nitrogênio com pH inicial igual a 7, com e sem adição de propionato, a 30°C, 2,5 Hz e 48h.....	72
Tabela 13 - Valores do pH final e da biomassa obtidos no cultivo de <i>Chromobacterium violaceum</i> sob limitação de nitrogênio com pH inicial igual a 6, com e sem adição de propionato, a 30°C, 2,5 Hz e 48h.....	73
Tabela 14 - Valores do pH final e da biomassa obtidos no cultivo de <i>Chromobacterium violaceum</i> sob limitação de fósforo com pH inicial igual a 7, com e sem adição de propionato, a 30°C, 2,5 Hz e 48h.....	74

Tabela 15 - Valores do pH final e da biomassa obtidos no cultivo de <i>Chromobacterium violaceum</i> sob limitação de fósforo com pH inicial igual a 6, com e sem adição de propionato, 30°C, 2,5 Hz e 48h. ....	75
Tabela 16 - Condições de cultivo, biomassa produzida ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), quantidade de PHAs ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), acúmulo de PHAs em 100 g de biomassa ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e quantidade de butirato ou valerato em 100 g de PHBV ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) produzidos por <i>Chromobacterium violaceum</i> sob limitação de nitrogênio a 30°C durante 48 horas em agitador orbital.....	77
Tabela 17 - Condições de cultivo, biomassa produzida ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), quantidade de PHAs ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), acúmulo de PHAs em 100 g de biomassa ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e quantidade de butirato ou valerato em 100 g de PHBV ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) produzidos por <i>Chromobacterium violaceum</i> sob limitação de fósforo a 30°C durante 48 horas em agitador orbital.....	80
Tabela 18 - Biomassa produzida ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), quantidade de PHAs obtidos ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) e quantidade de butirato ou valerato em 100 g de PHBV ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) produzidos em biorreator por <i>Chromobacterium violaceum</i> sob limitação de nitrogênio, 30°C, pH 7, concentração de glicose de 20 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .....	85
Tabela 19 - Biomassa produzida ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), quantidade de PHAs obtidos ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) e quantidade de butirato ou valerato em 100 g de PHBV ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) produzidos em biorreator por <i>Chromobacterium violaceum</i> sob limitação de fósforo a 30°C, pH 7 e concentração de glicose de 20 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .....	88
Tabela 20 - Localização e atribuições das principais bandas de infravermelho dos polímeros PHB (produzido por <i>Cupriavidus necator</i> ) e PHBV (produzidos por <i>Chromobacterium violaceum</i> ). ....	97
Tabela 21 - Valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ) e grau de cristalinidade ( $\chi_c$ ) obtidos por DSC para as amostras de PHBV sintetizadas por <i>Chromobacterium violaceum</i> a 30°C, pH 7 e concentração de glicose de 20 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . ....	100
Tabela 22 - Dados de TGA para temperatura inicial de perda de massa ( $T_i$ ) e temperatura máxima de degradação térmica ( $T_{\text{pico}}$ ) dos copolímeros PHBV obtidos de <i>C. violaceum</i> a 30°C, pH 7 e concentração de glicose de 20 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . ....	104

## NOMENCLATURA

---

$\chi_c$	- Grau de cristalinidade
$\Delta H_c$	- Entalpia de cristalização ( $J \cdot g^{-1}$ )
$\Delta H_m$	- Entalpia de fusão ( $J \cdot g^{-1}$ )
$\Delta H_m^0$	- Entalpia de fusão considerando polímero 100% cristalino ( $J \cdot g^{-1}$ )
5POHV	- Poli(3-hidroxi-5-fenoxivalerato)
AHL	- N-acil-homoserina lactona
AS	- Antranilato sintase
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
CG	- Cromatografia gasosa
cPHB	- Poli-hidroxibutirato com baixa massa molecular
Da	- Daltons
DNS	- Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DSC	- Calorimetria exploratória diferencial
DSM	- <i>Deutsche Sammlung vor Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
FTIR	- Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
GPC	- Cromatografia de permeação em gel
HHL	- N-hexanoil-L-homoserina lactona
LB	- Meio Luria-Bertoni
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
MM	- Meio mineral
$M_w$	- Massa molecular (Da)
NMR	- Ressonância magnética nuclear
OdDHL	- Oxododecanoil-L-homoserina lactona
OHHL	- Oxohexanoil-L-homoserina lactona
P(3HB)	- Poli(3-hidroxibutirato)

P(3HB4PE)	- Poli(3-hidroxibutirato-4-pentenoato)
P(3HB- <i>co</i> -3HV)	- Poli(3-hidroxibutirato- <i>co</i> -3-hidroxivalerato)
P(3HB- <i>co</i> -3HV- <i>co</i> -5HV)	- Poli(3-hidroxibutirato- <i>co</i> -3-hidroxivalerato- <i>co</i> -5-hidroxivalerato)
P(3HB- <i>co</i> -4HB)	- Poli(3-hidrobutirato- <i>co</i> -4-hidroxibutirato)
P(3HO- <i>co</i> -3HH)	- Poli(3-hidroxi octanoato- <i>co</i> -3-hidroxi exanoato)
P(3HV)	- Poli(3-hidroxivalerato)
P(4HB)	- Poli(4-hidroxibutirato)
P(5HV)	- Poli(5-hidroxivalerato)
PHA <sub>LCL</sub>	- Poli-hidroxialcanoatos de cadeia longa ( <i>long chain length</i> )
PHA <sub>MCL</sub>	- Poli-hidroxialcanoatos de cadeia média ( <i>medium chain length</i> )
PHAs	- Poli-hidroxialcanoatos
PHA <sub>SCL</sub>	- Poli-hidroxialcanoatos de cadeia curta ( <i>short chain length</i> )
PHB	- Poli(3-hidroxibutirato)
PHBHHx	- Poli(3-hidroxibutirato- <i>co</i> -3-hidroxi exanoato)
PHBV	- Poli(3-hidroxibutirato- <i>co</i> -3-hidroxivalerato)
P <sub>PHBV</sub>	- Produtividade de PHBV
S	- Substrato
T <sub>C</sub>	- Temperatura de cristalização
T <sub>g</sub>	- Temperatura de transição vítrea
TGA	- Análise termogravimétrica
T <sub>i</sub>	- Temperatura de início de degradação térmica
T <sub>m</sub>	- Temperatura de fusão
T <sub>pico</sub>	- Temperatura máxima de degradação térmica
UHMW-PHB	- PHB com massa molecular ultra-elevada ( <i>ultra-high-molecular weight</i> - PHB)
X	- Biomassa (g)
Y <sub>PHBV/S</sub>	- Fator de conversão de substrato em produto (g·g <sup>-1</sup> )
Y <sub>X/S</sub>	- Fator de conversão de substrato em biomassa (g·g <sup>-1</sup> )

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>31</b>
3.1 - <i>Chromobacterium violaceum</i> .....	31
3.2 - Poli-hidroxiálcanoatos (PHAs).....	35
3.2.1 Características dos PHAs.....	37
3.2.2 Propriedades físicas e químicas dos PHAs.....	40
3.2.3 Organismos produtores de PHAs .....	43
3.2.4 Metabolismo de síntese dos PHAs .....	49
3.2.5 Aplicações dos PHAs .....	55
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
4.1 - Microrganismo .....	59
4.2 - Produção de poli-hidroxiálcanoatos .....	59
4.2.1 Estudos em agitador orbital ( <i>shaker</i> ).....	59
4.2.2 Estudos em biorreator de bancada .....	61
4.3 - Extração e preparação dos filmes de PHAs .....	63
4.3.1 Extração dos poli-hidroxiálcanoatos.....	63
4.3.2 Preparação dos filmes de PHAs.....	63
4.4 - Técnicas analíticas.....	64
4.4.1 Determinação da concentração de biomassa .....	64
4.4.2 Determinação da concentração de substrato.....	64
4.4.3 Dosagem de nitrogênio.....	65
4.4.4 Dosagem de fósforo.....	65
4.4.5 Dosagem de poli-hidroxiálcanoatos .....	66

4.5 - Caracterização dos biopolímeros.....	67
4.5.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	67
4.5.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	68
4.5.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	68
4.5.4 Análise termogravimétrica (TGA) .....	68
4.6 - Metodologias utilizadas nos cálculos .....	69
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>
5.1 - Produção de poli-hidroxicanoatos em <i>Chromobacterium violaceum</i> .....	71
5.1.1 Produção de PHAs em <i>C. violaceum</i> em agitador orbital .....	71
5.1.2 Produção de PHAs em <i>C. violaceum</i> em biorreator .....	83
5.2 - Caracterização dos biopolímeros.....	90
5.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	92
5.2.2 Espectrometria na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	93
5.2.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	98
5.2.4 Análise termogravimétrica (TGA) .....	102
<b>CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>107</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>109</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>123</b>



# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

---

A partir da descoberta da forma da dupla hélice do DNA em 1953, abriu-se um mundo novo de perspectivas relacionadas à biotecnologia. A manipulação do genoma de plantas e bactérias através da técnica do DNA recombinante permitiu o melhoramento e o desenvolvimento de aplicações e soluções biotecnológicas, incluindo processos industriais enzimáticos e produtos de interesse biomédico, como novos fármacos e biomateriais.

O sequenciamento do genoma da *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 revelou a grande versatilidade desta bactéria. A *C. violaceum* é capaz de produzir uma ampla diversidade de metabólitos secundários com grande potencial biotecnológico. A análise do seu genoma permitiu também entender a habilidade que esta bactéria tem de se adaptar a diversas condições ambientais. Esta adaptabilidade é facilitada por seu metabolismo versátil, capaz de utilizar uma ampla faixa de fontes de energia através do uso de oxidases e redutases apropriadas, permitindo também a exploração de sua capacidade de respiração aeróbia ou anaeróbia (Brazilian National Genome Project Consortium, 2003).

Entre os diversos potenciais biotecnológicos desta bactéria merece destaque a violaceína, pigmento violeta de estrutura relativamente simples que apresenta propriedades antibióticas, antitumorais, antiparasitárias e antivirais. Outra aplicação interessante é a capacidade que a *C. violaceum* possui de biossintetizar poli-hidroxicanoatos, poliésteres biológicos com aplicações industriais e biomédicas. Mais recentemente, estudos comprovaram que a *C. violaceum* produz em seu biofilme a celulose bacteriana, que pode ser utilizada como substituto artificial de pele em queimaduras, ferimentos, recuperação de lesões e *scaffolds*.

Devido à grande quantidade de aplicações e dúvidas existentes, e ao fato de seu genoma ter sido sequenciado e estar publicamente disponível, a *C. violaceum* foi escolhida como organismo modelo para os estudos do Grupo de Engenharia Genômica da Universidade Federal de Santa Catarina. Considerando a complexidade de se estudar todos os aspectos relacionados à *C. violaceum* e devido ao grande potencial

biotecnológico apresentado, a biossíntese da violaceína e a produção dos biopolímeros celulose e poli-hidroxicanoatos foram escolhidos como alvos de interesse do grupo.

Os estudos realizados pelo grupo de Engenharia Genômica incluíram a análise bioinformática do genoma de *C. violaceum*, buscando identificar nas vias de biossíntese de cada um dos alvos estudados os genes, as proteínas, e a regulação de cada uma das vias. Os estudos do grupo têm permitido identificar características importantes dessas vias, avançando os conhecimentos sobre a violaceína (Oliveira, 2005), a celulose bacteriana (Recouvreux, 2004; Recouvreux et al., 2008) e os poli-hidroxicanoatos (Piemolini, 2004; Bressan, 2007). Métodos e modelos computacionais foram desenvolvidos para analisar as vias de *C. violaceum* (Goudel, 2005), aplicar técnicas de engenharia metabólica para o estudo da violaceína (Mendes, 2006), identificar os genes de patogenicidade em *C. violaceum* (Becker, 2008), e desenvolver uma nova metodologia para abordar os mecanismos reguladores das vias de biossíntese de *C. violaceum* utilizando Redes de Petri (Simão, 2006).

Os produtos de interesse biomédico têm sido estudados em escala laboratorial, buscando otimizar sua produção e testar possíveis aplicações. Oliveira (2005) analisou o mecanismo de regulação *quorum sensing* envolvido na produção de violaceína pela *C. violaceum*, enquanto Pitlovanciv (2005) estudou as propriedades antibióticas dos extratos obtidos na produção da violaceína. Rodrigues (2007), utilizando a tecnologia do DNA recombinante, clonou e expressou o *operon vioABCDE* de *C. violaceum* em *Escherichia coli*, buscando aumentar a produção de violaceína.

Com relação aos biopolímeros, Recouvreux (2004) demonstrou que a *C. violaceum* produz celulose como um dos componentes do seu biofilme, possuindo propriedades que permitem a sua utilização em aplicações biomédicas. Estudos também envolveram a otimização da produção de poli-hidroxicanoatos (Viegas, 2005) e a engenharia genética da PHA sintase, enzima chave na produção dos PHAs, que foi clonada e expressada em *E. coli* (Piemolini, 2004; Bressan, 2007).

Poli-hidroxicanoatos (PHAs) são um tipo especial de biomaterial acumulado em condições desfavoráveis de crescimento na presença de excesso de fonte de carbono e a limitação de um nutriente essencial (N, P, S) por numerosos microrganismos como reserva energética e poder redutor. Estes biopolímeros têm despertado grande interesse devido às suas características como biodegradabilidade, biocompatibilidade, biossíntese a partir de recursos renováveis,

propriedades termoplásticas próximas às dos plásticos sintéticos e, após sua disposição na natureza, completa degradação por microrganismos em água e CO<sub>2</sub> (Mergaert et al., 1996; Yasotha et al., 2006).

A principal limitação para o aumento da produção dos PHAs é o elevado custo de produção e recuperação. Atualmente, a utilização da engenharia genética e da engenharia metabólica tem permitido a biossíntese destes polímeros em diversos organismos recombinantes como, por exemplo, bactérias, leveduras e plantas transgênicas, aumentando assim a quantidade obtida e a diminuição dos custos (Choi e Lee, 2000; Breuer et al., 2002; Steinbüchel e Lutke-Eversloh, 2003; De Oliveira et al., 2004; Suriyamongkol et al., 2007).

A *C. violaceum* possui a capacidade de biossintetizar PHAs de cadeia curta utilizando glicose e ácidos orgânicos como co-substratos. Para a produção do homopolíéster poli(3-hidroxicaproato), ácido valérico é utilizado como único substrato. Já na síntese do copolímero poli(3-hidroxicaproato-co-3-hidroxicaproato), apenas glicose é utilizada como fonte de carbono pela *C. violaceum* (Steinbüchel e Fuchtenbusch, 1998; Kolibachuk et al., 1999; Viegas, 2005).

Este trabalho estudou variáveis-chave e diferentes condições de operação para a produção dos copolímeros poli-(3-hidroxicaproato-co-3-hidroxicaproato) produzidos por *C. violaceum*. Foram realizados ensaios tanto em frasco agitados (escala laboratorial) como em biorreator de bancada, de 4 litros. Os copolímeros obtidos nos ensaios em biorreator foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TGA), cromatografia gasosa (CG) e inspeção visual da incorporação de violaceína.



## CAPÍTULO 2

### OBJETIVOS

---

O objetivo deste trabalho foi estudar sistematicamente as condições de produção do copolímero poli(3-hidroxi-*butirato-co*-3-hidroxi-*valerato*) por *Chromobacterium violaceum* em agitador orbital (*shaker*) e biorreator de bancada de 4 litros, analisando a influência do pH, do nutriente limitante, da concentração do substrato glicose e da adição de propionato sobre a composição e propriedades físico-químicas dos copolímeros produzidos.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Estudar a influência em escala laboratorial do nutriente limitante, do pH e da concentração da fonte de carbono na produção do copolímero poli(3-hidroxi-*butirato-co*-3-hidroxi-*valerato*) em *C. violaceum*.
- Verificar a influência do co-substrato propionato na produção do copolímero poli(3-hidroxi-*butirato-co*-3-hidroxi-*valerato*) por *C. violaceum* em agitador orbital variando o nutriente limitante, o pH e a concentração da fonte de carbono.
- Produzir em biorreator de bancada o copolímero poli(3-hidroxi-*butirato-co*-3-hidroxi-*valerato*) variando o nutriente limitante e verificando a influência da adição de propionato.
- Determinar a composição qualitativa e quantitativa dos copolímeros produzidos por *C. violaceum* em escala laboratorial e em biorreator de bancada.
- Caracterizar os polímeros produzidos quanto à sua composição e propriedades físico-químicas utilizando cromatografia gasosa (CG), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TGA).



### 3.1 - *Chromobacterium violaceum*

A bactéria *Chromobacterium violaceum* é classificada como uma  $\beta$ -proteobactéria, quimiorganotrófica, Gram-negativa e anaeróbia facultativa. É considerada uma bactéria saprófita, sendo encontrada no solo e em águas ao redor do mundo em extensas áreas da biodiversidade tropical e subtropical (Richards, 1993).

No Brasil, a *C. violaceum* encontra-se amplamente distribuída nas águas e nas bordas dos rios da região amazônica, principalmente do Rio Negro (Duran e Menck, 2001). Ela foi identificada pela primeira vez no Brasil em 1976 pelo Prof. Wilson Chagas de Araújo, do Instituto de Microbiologia da UFRJ, em amostras retiradas da estação de tratamento de água da cidade de Manaus (Amazonas) (Rettori, 1996). Atualmente, várias cepas de *C. violaceum* foram isoladas e caracterizadas em diversas regiões do Brasil. A partir das águas e lodo do Rio Negro, no Amazonas, Hungria e colaboradores (2005) analisaram 22 novos isolados de *C. violaceum*, caracterizando duas novas linhagens. Em Santa Catarina, sul do Brasil, foram obtidos 95 isolados de *C. violaceum* do Rio Itajaí-Açú (Adonai, 2007).

A *C. violaceum* é uma bactéria versátil, produzindo uma ampla diversidade de metabólitos secundários com grande potencial biotecnológico. Em 2000, o Ministério de Ciência e Tecnologia (MCT) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), decidiram realizar o sequenciamento e análise do genoma de *C. violaceum*, linhagem ATCC 12472. O estudo foi realizado por um consórcio de 25 laboratórios espalhados pelo Brasil e pelo Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC), responsável pela análise e montagem da sequência de nucleotídeos do genoma (Brazilian National Genome Project Consortium, 2003).

A análise do genoma de *C. violaceum* permite entender a habilidade que esta bactéria tem de se adaptar a diversas condições ambientais. Esta adaptabilidade é facilitada por seu metabolismo versátil, capaz de utilizar uma ampla faixa de fontes de energia através

do uso de oxidases e redutases apropriadas, permitindo também a sua capacidade de respiração aeróbia ou anaeróbia (Brazilian National Genome Project Consortium, 2003).

Em condições aeróbias *C. violaceum* é capaz de crescer em meio mínimo utilizando açúcares simples, tais como, glicose, frutose, galactose e ribose, sendo que tanto a via de Embden-Meyerhoff quanto os ciclos do ácido tricarbóxico e glioxilato são utilizados. O suprimento de energia é provido da cadeia respiratória e também de outras vias metabólicas. Em condições anaeróbias, *C. violaceum* metaboliza glicose, produzindo ácido acético e ácido fórmico, sem a produção de ácido láctico ou etanol. Esta bactéria também é capaz de utilizar aminoácidos e lipídeos como fonte de suprimento energético (Antônio e Creczynski-Pasa, 2004).

A *C. violaceum*, sendo um organismo de vida livre, possui a capacidade de sintetizar e catabolizar todos os 20 aminoácidos, bem como os nucleotídeos purina e pirimidina, utilizando vias metabólicas central e intermediárias. É capaz de realizar a biossíntese de polissacarídeos complexos como celulose (mas não glicogênio) e também a síntese e degradação de uma variedade de lipídeos, que são utilizados para a formação de membrana e armazenamento energético, incluindo triacilglicerol, fosfolipídeo e lipopolissacarídeo (Brazilian National Genome Project Consortium, 2003).

Entre os diversos potenciais biotecnológicos desta bactéria, a violaceína merece um lugar de destaque. Característica fenotípica marcante de *C. violaceum*, este pigmento violeta intracelular tem sido muito estudado por apresentar propriedades antibióticas, antitumorais, antiparasitárias e antivirais (Duran e Menck, 2001; Leon et al., 2001; Andrighetti-Frohner et al., 2003). Outras características que podem ser citadas são a hidrólise de filmes plásticos (Gourson et al., 1999) e a solubilização de ouro, evitando assim a utilização de mercúrio (Smith e Hunt, 1985; Campbell et al., 2001).

Barreto e colaboradores (2008) investigaram 24 cepas de *C. violaceum* obtidas no Amazonas, região norte brasileira, em relação ao seu potencial de controle biológico sobre sete fungos que contaminam os grãos da soja, observando o controle de pelo menos seis tipos deles.

A produção de violaceína em *C. violaceum* ATCC 12472 foi estudada por Mendes e colaboradores (2001). Um máximo de 21 g·l<sup>-1</sup> de biomassa e 0,43 g·l<sup>-1</sup> de violaceína foram obtidos quando o meio de cultivo contendo 10,4 g·l<sup>-1</sup> de glicose, 16,8 g·l<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 1,00 g·l<sup>-1</sup> de peptona, 1,14 g·l<sup>-1</sup> de L-triptofano e 0,0625 mM de sulfato de zinco foi incubado a temperatura de 33°C e agitação de 300·g.



A violaceína é formada pela união de duas moléculas de L-triptofano. No genoma de *C. violaceum* ATCC 12472 foram anotados como codificadores das enzimas da via de biossíntese do triptofano os genes *trpA-F* e *pabA-B*, estes últimos pertencentes também à via do folato. Todos os genes estão dispersos na fita reversa, exceto *trpC*. Os genes *trpF*, *trpB* e *trpA* estão em sequência na mesma fita, separados por alguns pares de base, estando os demais dispersos ao longo do genoma (Brazilian National Genome Project Consortium, 2003). A Figura 1 apresenta a organização dos genes de biossíntese do triptofano em *C. violaceum* ATCC 12472.

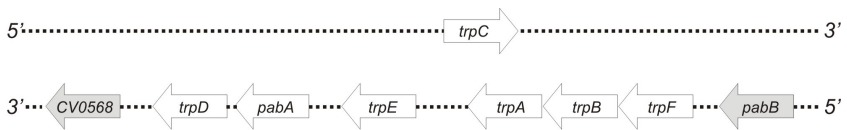


Figura 1 - Organização dos genes de biossíntese do triptofano em *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. Os genes em destaque (*CV0568* e *pabB*) foram removidos da via de biossíntese (Carminatti et al., 2008).

O resultado da análise das ORFs *trpE*, *CV0568*, *pabA* e *pabB*, anotados como fazendo parte da enzima antranilato sintase (AS), permitiu concluir que a AS é uma enzima dimérica, composta pelas subunidades  $\alpha$  (TrpE) e  $\beta$  (PabA). As subunidades TrpE e PabA possuem sítios catalíticos, enquanto o sítio de ligação do triptofano (sítio alostérico) encontra-se presente apenas na subunidade TrpE. Na Figura 2 são apresentadas as proteínas TrpE e PabA modeladas por homologia para a enzima antranilato sintase de *C. violaceum*.

A capacidade de biossíntese de celulose pela *C. violaceum* ATCC 12472, sequenciada pelo Projeto Genoma Brasileiro, foi demonstrada por Recouvreux (2004), que analisou o genoma de *C. violaceum*, sugerindo a organização dos genes de biossíntese de celulose na forma de dois *operon* – *yhjQbcsABZCCV2674* e *bcsGECV2671CV2670*, sendo a maioria das sequências homólogas aos genes de biossíntese de celulose das bactérias *Salmonella typhimurium* LT2 e *E. coli* K12 (Recouvreux et al., 2008).

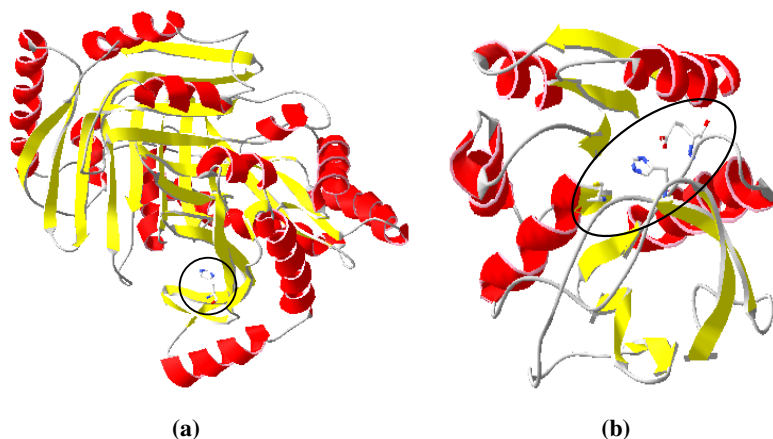


Figura 2 - Estruturas modeladas por homologia para as subunidades (a) TrpE e (b) PabA de *Chromobacterium violaceum* (Carminatti et al., 2008).

A comprovação experimental foi realizada cultivando *C. violaceum* em meio Luria-Bertoni (LB) durante 24 horas. Em condições estáticas, ocorreu a formação de uma película impermeável na superfície ar/líquido (Figura 3a), enquanto em agitador orbital não houve a formação da película (Figura 3b). Porém, a adição de etanol à cultura levou à agregação do biofilme, sendo possível recolher o material resultante (Figura 3c). A hidrólise enzimática das amostras obtidas permitiu a quantificação da glicose presente em cada amostra. Os resultados apresentados evidenciaram a presença de celulose no biofilme produzido por *C. violaceum* (Recouvreur, 2004; Recouvreur et al., 2008).

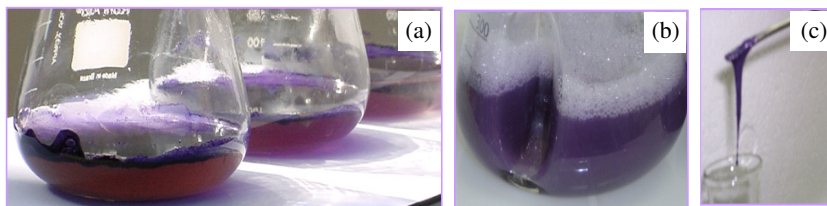


Figura 3 - Culturas estática (a) e agitada (b) realizadas com *Chromobacterium violaceum* em meio LB. (c) Coleta com seis dias de cultivo e precipitação do meio com etanol (Recouvreur, 2004).

### 3.2 - Poli-hidroxicanoatos (PHAs)

Poli-hidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres compostos por monômeros de ácidos 3-hidroxicanoícos sintetizados e armazenados intracelularmente como reserva energética e poder redutor, podendo chegar a 90% da massa celular seca do organismo. Sua biossíntese ocorre em condições desfavoráveis de crescimento como, por exemplo, a limitação de um nutriente essencial como nitrogênio, fósforo e/ou oxigênio, e na presença de excesso de fonte de carbono (Anderson e Dawes, 1990; Timm e Steinbüchel, 1990; Madison e Huisman, 1999).

Os PHAs possuem cadeias lineares, sendo que a polimerização acontece devido à ligação entre o grupamento carboxila de um monômero e o grupamento hidroxila de outro monômero, formando um poliéster. PHAs são geralmente produzidos como polímeros contendo  $10^3$  a  $10^4$  monômeros, acumulados na forma de inclusões com diâmetro variando entre 0,2 e 0,5  $\mu\text{m}$  (Figura 4). Estas inclusões são sintetizadas e armazenadas por bactérias gram-positivas e gram-negativas, não produzindo efeitos negativos ao hospedeiro (Madison e Huisman, 1999; Luengo et al., 2003).

Os grânulos acumulados pelas bactérias são envoltos por uma camada fosfolipídica, por polimerases, despolimerases e proteínas citosólicas não específicas. Embora a função da monocamada fosfolipídica ainda não esteja clara, supõe-se que ela seja necessária para evitar o contato dos PHAs com a água, evitando assim a formação de grânulos com uma forma cristalina mais estável, o que impediria a sua degradação posterior pelas despolimerases (Luengo et al., 2003).

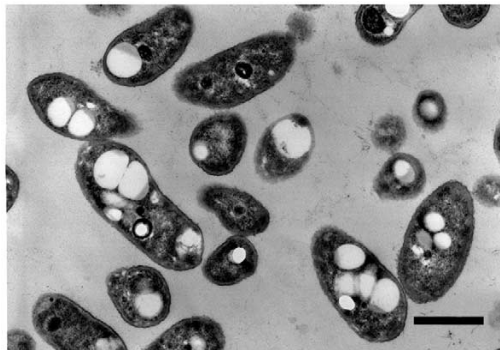


Figura 4 - Grânulos de poli-hidroxicanoatos (PHAs) acumulados em *Pseudomonas putida* (Luengo et al., 2003).

A partir da descoberta do poli(3-hidroxiбутирато) (P(3HB) ou PHB) em 1926 por Lemoigne, no Instituto Pasteur, diversos outros PHAs foram isolados de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A Tabela 1 apresenta um breve histórico da produção e comercialização dos PHAs.

Tabela 1 - Breve histórico dos poli-hidroxiácidoalcanoatos.

<b>Ano</b>	<b>Fato marcante</b>
1925	Lemoigne: descoberta do PHB
1958	Macrae e Wilkinson: o biopolímero é uma reserva de carbono e energia
1973	Desenvolvimento da Análise do Controle Metabólico
1974	Wallen e Rohwedder: identificação de outros monômeros além do ácido 3-hidroxiбутírico
1980	Início da produção do Biopol <sup>®</sup> (copolímero PHBV) pela Imperial Chemical Industries (ICI)
1988	Primeira clonagem completa do <i>operon phb</i>
1988	Início da biossíntese de P(3HB) em <i>Escherichia coli</i>
1990	Lançamento do primeiro produto comercial baseado em PHAs: frasco de shampoo para a Wella (Alemanha)
1991	Proposta a metodologia para Engenharia Metabólica
1992	Firmada parceria entre a COPERSUCAR, o IPT e o ICB/USP para desenvolver pesquisas para a produção de PHB
1993	Analisada a limitação de nitrogênio na produção de PHAs
1996	Monsanto adquire o processo de produção do BIOPOL <sup>®</sup>
1997	Analisado o efeito da fonte de carbono na síntese de PHAs
1998	Identificado o mecanismo de biossíntese de PHB
1999	Analisada a limitação de oxigênio na produção de PHAs
2000	Brasileira PHB Industrial S.A. começa a produzir o BioCycle <sup>®</sup>
2000	Chinesa Ningbo Tianan Biomaterials Co., Ltd começa a produzir PHBV a partir de milho
2001	Identificados os fatores de controle da produção de PHB
2001	Metabolix adquire os direitos de produção do BIOPOL <sup>®</sup>
2004	Metabolix e ADM lançam comercialmente o bioplástico Mirel <sup>®</sup>
2006	Brasileira Injecom Ltda. lança embalagem para mudas de eucalipto feita a partir de BioCycle <sup>®</sup>
2008	Sutura reabsorvível a base de PHAs, TephafLEX <sup>®</sup> , é aprovada pelo FDA para aplicações clínicas

Os PHAs têm despertado grande interesse devido as suas características, como biossíntese a partir de recursos renováveis, propriedades termoplásticas próximas as dos plásticos sintéticos e, após sua disposição na natureza, completa degradação por microrganismos em água e CO<sub>2</sub> (Mergaert et al., 1996; Yasotha et al., 2006).

Do ponto de vista biomédico, características como biodegradabilidade, biocompatibilidade, estereoespecificidade, atividade óptica e termoplaticidade tornam estes ésteres importantes biomateriais para o desenvolvimento de novos *scaffolds* para engenharia de tecidos (Williams et al., 1999; Kose et al., 2003).

Atualmente, as pesquisas relacionadas aos poli-hidroxicanoatos direcionaram seus esforços para os seguintes temas-chave para a sua produção: obtenção de microrganismos eficientes no acúmulo de PHAs; produção destes materiais pelo uso de matérias-primas de baixo custo e renováveis pela agricultura; aumento de produtividade, pelo cultivo microbiano a alta densidade celular; busca de reatores alternativos e, adequação das características do produto pela modulação da massa molecular (Da Silva et al., 2007).

### 3.2.1 Características dos PHAs

Dependendo da bactéria utilizada, dos substratos e suplementos fornecidos e das condições de cultivo, uma grande variedade de poliésteres pode ser sintetizada com diferentes composições poliméricas (Braunegg et al., 1998). Mais de 150 diferentes tipos de ácidos hidroxialcanóicos, naturais e sintéticos, foram caracterizados como constituintes dos PHAs (Rehm, 2003). A variação do comprimento, da composição e a habilidade de modificar os substituintes da cadeia lateral é a base para a diversidade de PHAs existentes, permitindo uma extensa gama de aplicações. A cadeia lateral pode conter desde o metil até o tridecil, sendo possível a existência de cadeias não necessariamente saturadas, tais como: aromáticas, insaturadas, halogenadas, epoxidizadas e cadeias ramificadas (Madison e Huisman, 1999; Stubbe et al., 2005). Entretanto, apenas alguns tipos de PHAs são produzidos em quantidade suficiente para permitir sua caracterização e para desenvolver potenciais aplicações (Lee, 1996b).

A Figura 5 apresenta a fórmula geral dos poli-hidroxicanoatos, exemplos de monômeros estruturais dos PHAs e a fórmula do copolímero poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato).

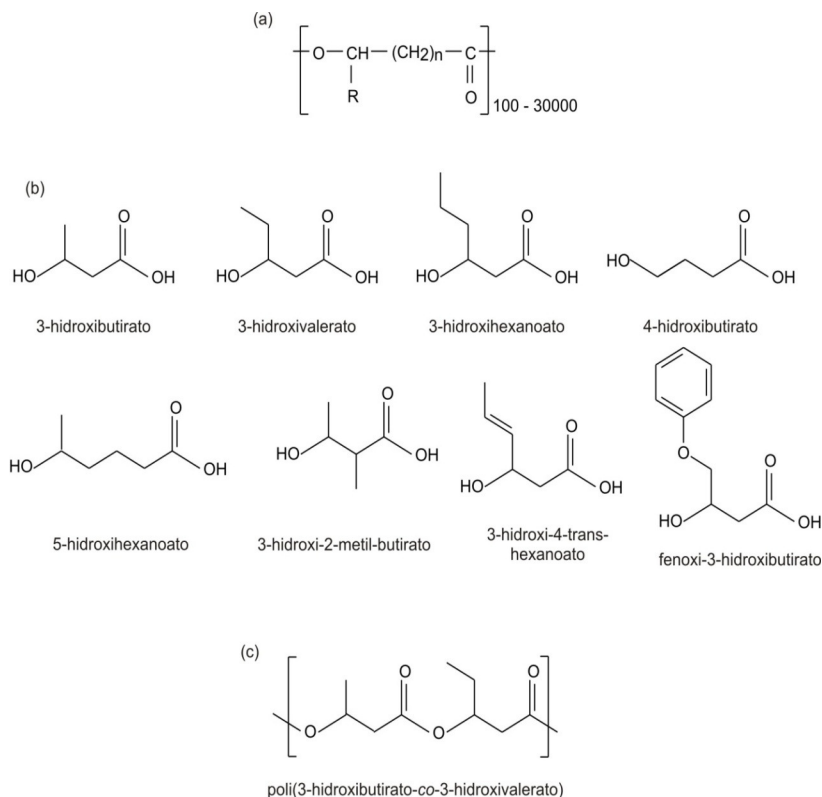


Figura 5 - (a) Fórmula geral dos poli-hidroxiálcanoatos (PHAs) (b) Exemplos de monômeros estruturais dos PHAs (c) Fórmula geral do copolímero poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato).

Atualmente, os poli-hidroxiálcanoatos podem ser divididos em três classes. Os PHAs formados por monômeros de cadeia curta (3 a 5 átomos de carbono) são conhecidos como PHA<sub>SCL</sub> (PHA *short chain length*). Os PHA<sub>MCL</sub> (PHA *medium chain length*) são formados por monômeros contendo de 6 a 14 átomos de carbono, enquanto os polímeros contendo monômeros com mais de 14 átomos de carbono são conhecidos como PHA<sub>LCL</sub> (PHA *long chain length*) (Madison e Huisman, 1999). A Tabela 2 apresenta a classificação dos PHAs de acordo com diferentes critérios.

Tabela 2 - Classificação dos PHAs de acordo com diferentes critérios.

---

### **Origem biossintética**

---

Bioplásticos naturais: produzidos por microrganismos a partir de metabólitos (ex. PHAs alifáticos).

Bioplásticos semi-sintéticos: requerem a adição ao meio de cultura de precursores que não são sintetizados pelo organismo (ex. PHAs contendo monômeros aromáticos).

Bioplásticos sintéticos: poliésteres que se parecem com polímeros naturais, mas que somente podem ser obtidos por síntese química (ex. polímeros termoplásticos sintéticos).

---

### **Natureza química dos monômeros**

---

Bioplásticos contendo derivados de ácidos graxos alifáticos: monômeros saturados ou insaturados, monômeros lineares ou ramificados, substituídos ou não (com grupos funcionais nos monômeros).

Bioplásticos contendo derivados de ácidos graxos aromáticos.

Bioplásticos contendo derivados alifáticos e de ácidos graxos aromáticos.

Bioplásticos contendo outros diferentes compostos (ex. poli-ácido glutâmico, poli-e-L-lisina, poli-ácido b-L-málico, ácido poli-glicólico, cianoficina).

---

### **Tamanho do monômero**

---

PHA<sub>SCL</sub>: contendo monômeros com 3 a 5 átomos de carbono.

PHA<sub>MCL</sub>: contendo monômeros com 6 a 14 átomos de carbono.

PHA<sub>LCL</sub>: contendo monômeros com mais de 14 átomos de carbono.

---

### **Número de monômeros no poliéster**

---

Homopolímeros: um único tipo de monômero está presente no bioplástico.

Heteropolímeros (copolímeros): mais de um tipo de monômero compõe o bioplástico.

---

### **Tipo de monômeros acumulados pelo microrganismo**

---

Um único bioplástico.

Mistura de bioplásticos (blendas).

---

Fonte: Adaptado de Luengo et al., 2003.

O mais simples e comum da família dos poli-hidroxiálcanoatos (PHAs) é o poli(3-hidroxi-butirato) (P(3HB) ou PHB). O homopolímero PHB é um poliéster largamente encontrado na natureza devido ao grande número de bactérias, tanto Gram positivas como Gram negativas, produtoras deste polímero a partir de fontes simples de carbono como sacarose, glicose e frutose.

PHB com baixa massa molecular (cPHB;  $M_w < 14$  kDa) foi encontrado em *Bacillus subtilis*, *Azotobacter vinelandii* e *Streptomyces lividans* associado com íons cálcio e polifosfatos. cPHB também foi encontrado em células eucarióticas, por exemplo, em leveduras; no amendoim; no intestino de carneiros e no músculo de gatos (Reusch e Sadoff, 1988; Reusch, 1995).

Outro biopolímero largamente estudado e caracterizado é o copolímero poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (P(3HB-co-3HV) ou PHBV), que pode conter quantidades variáveis de unidades de 3-hidroxi-valerato (3HV). A obtenção de PHBV em bactérias como *Cupriavidus necator* e *Escherichia coli* recombinante utiliza glicose como fonte de carbono e como co-substrato o ácido propiônico ou ácido valérico, sendo que a taxa de incorporação de 3-hidroxi-valerato é proporcional à quantidade de precursor utilizado (Anderson e Dawes, 1990; Doi et al., 1990; Trotsenko e Belova, 2000). Contudo, a elevada toxicidade do propionato resulta em uma baixa incorporação de 3HV ao copolímero (Du et al., 2001).

O poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-exanoato) (PHBHHx) é um exemplo de copolímero contendo unidades monoméricas de cadeia curta e média. Este composto apresenta propriedades similares ao polietileno de baixa densidade (Doi et al., 1995).

### 3.2.2 Propriedades físicas e químicas dos PHAs

As propriedades dos PHAs dependem principalmente do tipo de microrganismo utilizado, do substrato carbônico fornecido e das condições de cultivo. Estes fatores determinam a composição química dos polímeros e sua massa molecular, que pode variar de 50 a 1000 kDa, sendo depositados intracelularmente sob a forma de grânulos citoplasmáticos hidrofóbicos, com cerca de 0,2 a 0,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Madison e Huisman, 1999).

Os PHAs são termoplásticos biodegradáveis que possuem suas propriedades físicas associadas ao tamanho das cadeias laterais do monômero. PHA<sub>SCL</sub> são frequentemente rígidos e quebradiços, enquanto



PHA<sub>MCL</sub> são elastoméricos. Copolímeros PHA<sub>SCL-MCL</sub> são elastoméricos e adesivos, sendo termoplásticos amorfos com vários graus de cristalinidade, possuindo propriedades entre os dois estados dependendo da fração dos monômeros de cadeia curta e de cadeia média (Li et al., 2007; Solaiman et al., 2008).

As propriedades dos PHAs permitem o desenvolvimento de aplicações nas mais diversas áreas. Estes biopolímeros são insolúveis em água, enantioméricos, não tóxicos, biocompatíveis, piezoelétricos, possuindo alto grau de polimerização (Steinbüchel e Fuchtenbusch, 1998).

O PHB possui propriedades mecânicas similares às do polipropileno, tais como elevada cristalinidade (55–80%), resistência à mistura, resistência à água, pureza óptica, boa estabilidade à radiação ultravioleta, barreira à permeabilidade de gases, biocompatibilidade, alta regularidade da cadeia carbônica e elevada massa molecular. Entretanto, devido a sua baixa estabilidade térmica e por ser um material rígido, relativamente quebradiço e pouco resistente ao estresse, ele tem sido pouco utilizado em aplicações industriais. Quanto à biodegradabilidade, se decompõe em uma diversidade de meios, liberando apenas água e gás carbônico. O PHB tem baixa estabilidade na fusão, decompondo-se a aproximadamente 200°C, temperatura muito próxima à sua temperatura de fusão (175°C) (Sudesh et al., 2000; Ojumu et al., 2004).

A bactéria *E. coli* recombinante contendo os genes *phaCAB* de *C. necator* foi capaz de produzir PHB com massa molecular ultra-elevada (UHMW-PHB – *ultra high molecular weight*-PHB) entre  $(0,4-1,0) \times 10^7$  Da utilizando glicose como fonte de carbono. As propriedades mecânicas de filmes e fibras preparados a partir de UHMW-PHB tiveram aumento superior a 400% (Kusaka et al., 1997; Kusaka et al., 1999). Isto demonstra que as propriedades físicas dos polímeros são altamente influenciadas pela massa molecular (Agus et al., 2006).

Para diminuir a fragilidade e melhorar a processabilidade do PHB podem ser empregados copolímeros de 3-hidroxiбутирато e 3-hidroxi valerato (PHBV), 3-hidroxi бутирато e 3-hidroxi exanoato (PHBHHx) e 3-hidroxi бутирато e 4-hidroxi бутирато (P(3HB-co-4HB)), que apresentam boa biodegradabilidade e biocompatibilidade, possuindo propriedades mecânicas melhores do que as do PHB (Chen e Wu, 2005).

A Tabela 3 apresenta uma comparação entre as propriedades físicas de alguns PHAs com o polipropileno.

Tabela 3 - Propriedades físicas de alguns poli-hidroxicanoatos e do polipropileno.

<b>Tipos de polímeros</b>	<b>Temp. fusão (°C)</b>	<b>Temp. transição vítrea (°C)</b>	<b>Cristalinidade (%)</b>	<b>Alongamento (%)</b>
P(3HB)	177	2	70	5
P(3HB-co-3HV) 80% HB/20% HV	145	-1	56	50
P(3HB-co-4HB) 84% 3HB/16% 4HB	150	-7	45	444
P(3HO-co-3HH) 91% 3HO/11% 3HH	61	-36	30	300
Polipropileno	176	-10	60	400

Fonte: Adaptado de Madison e Huisman, 1999.

A introdução de unidades de ácido 3-hidroxicanoico (3HV) ao PHB, formando o biopolímero PHBV, torna o copolímero mais flexível, moldável e menos cristalino, possuindo menor ponto de fusão e maior processabilidade do que o PHB. Este copolímero pode ser utilizado para a preparação de filmes com excelentes características físico-químicas e mecânicas e que podem ser processados a menores temperaturas (Madison e Huisman, 1999; Du et al., 2001).

A caracterização e recuperação dos PHAs têm evoluído de forma considerável nos últimos anos. Microscopia de força atômica e espectroscopia confocal Raman são técnicas utilizadas para a análise dos grânulos de poli(3-hidroxicanoatos). Bioplásticos podem ser isolados por centrifugação (extratos livres de restos celulares) ou por extração com solventes (biomassa seca) com clorofórmio, trifluoretanol, dicloroetano, carbonato de propileno, cloreto de metileno ou ácido dicloroacético. A determinação da massa molecular, geralmente entre 50 a 1000 kDa, é realizada por medidas de dispersão de luz, cromatografia de permeação em gel (GPC), análises de sedimentação e viscosidade intrínseca. A composição dos monômeros é determinada por

cromatografia gasosa (CG), espectrometria de massa (MS) e por ressonância magnética nuclear (NMR) (Luengo et al., 2003).

Outras propriedades físicas, tais como cristalinidade, polidispersividade, temperatura de fusão, entalpia de fusão, temperatura de transição vítrea e propriedades mecânicas são determinadas por diferentes métodos (Luengo et al., 2003).

### 3.2.3 Organismos produtores de PHAs

A produção industrial de poli-hidroxicarboxilatos requer a utilização de bactérias que possam ser cultivadas utilizando fontes baratas de carbono, com alta densidade celular, acumulando alta concentração de polímeros em um período relativamente curto de tempo, resultando em alta produtividade.

Apesar de serem conhecidos mais de 300 microrganismos capazes de sintetizar estes biopolímeros, somente *Cupriavidus necator* (anteriormente conhecida como *Alcaligenes eutropha* e depois *Ralstonia eutropha*), *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, alguns isolados de metilotrofos, *Pseudomonas oleovorans*, e linhagens recombinantes de *C. necator*, *E. coli* e *Klebsiella aerogenes* são considerados potenciais na produção industrial de PHAs (Lee, 1996b).

Os organismos produtores de poli-hidroxicarboxilatos podem ser divididos em dois grupos baseados nas condições de cultura requeridas para a síntese dos biopolímeros. Os microrganismos que pertencem ao primeiro grupo – *C. necator*, *Protomonas extorquens*, *P. oleovorans* e *C. violaceum*, entre muitos outros – requerem a limitação de um nutriente essencial como N, P, Mg, O ou S e excesso de fonte de carbono para o acúmulo dos PHAs. *A. latus*, *A. vinelandii* e *E. coli* recombinante pertencem ao segundo grupo, que acumula os polímeros durante o seu crescimento, não necessitando de limitação nutricional (Lee, 1996b).

A composição química e a quantidade acumulada de polímero dependem diretamente da bactéria e dos substratos utilizados. A Tabela 4 apresenta o percentual de acúmulo de PHAs para diversas bactérias a partir de diferentes fontes de carbono.

Tabela 4 - Produção de poli-hidroxicanoatos por diversas bactérias.

<b>Microrganismo</b>	<b>Fonte de carbono</b>	<b>Tipo de PHAs</b>	<b>Conteúdo de PHAs (%p/p)</b>
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Glicose	PHBV	38
	Glicose / Propionato	PHBV	28-34
	Valerato	PHBV	65
<i>Cupriavidus necator</i>	Gluconato	PHB	46-85
	Propionato	PHB	26-36
	Octanoato	PHB	38-45
<i>Bacillus megaterium</i> QMB 1551	Glicose	PHB	20
<i>Klebsiella aerogenes</i> recombinante	Melaço	PHB	65
<i>Methylobacterium rhodesianum</i> MB1267	Frutose / metanol	PHB	30
<i>Methylobacterium extorquens</i> ATCC5566	Metanol	PHB	40-46
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Óleos de euphóbio e de mamona	PHA <sub>MCL</sub>	20-30
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	Metanol	PHB	0,02
	Pentanol	PHB	55
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Gluconato	PHB	1,1-5,0
	Octanoato	PHB	50-68
<i>Pseudomonas putida</i> Gp104	Octanoato	PHB	14-22
<i>Pseudomonas putida</i>	Óleo de palma	PHA <sub>MCL</sub>	37
	Ácido láurico	PHA <sub>MCL</sub>	25
	Ácido mirístico	PHA <sub>MCL</sub>	28
<i>Pseudomonas putida</i> BM01	Ácido decanóico	5POHV	15-35
<i>Sphaerotilus natans</i>	Glicose	PHB	40

Fonte: Adaptado de Reddy et al., 2003.

### 3.2.3.1 *Cupriavidus necator*

A bactéria *Cupriavidus necator* (anteriormente conhecida como *Alcaligenes eutropha* e depois *Ralstonia eutropha*) é um microrganismo procariótico, Gram-negativo, quimiolitotrófico facultativo, encontrado naturalmente no solo e na água. *C. necator* é a bactéria utilizada como modelo para o estudo e a produção de poli-hidroxicanoatos, sendo utilizada para a produção industrial de PHAs devido ao seu elevado rendimento, sua elevada velocidade específica de produção e sua habilidade para crescer a partir de fontes renováveis de carbono (Byron, 1987; Squio e Aragão, 2004).

A cepa utilizada para produção industrial de PHAs é a mutante *C. necator* DSM545, a qual consome glicose como fonte de carbono (Madison e Huisman, 1999). A cepa nativa de *C. necator* H16 não utiliza glicose nem sacarose como fontes de carbono. Kek e colaboradores (2008) utilizaram a *C. necator* H16 para converter subprodutos de óleo de palma em poli-hidroxibutirato.

Os PHAs sintetizados pela *C. necator* podem conter monômeros de 3-hidroxibutirato (3HB), 3-hidroxivalerato (3HV), 4-hidroxibutirato (4HB) e 5-hidroxivalerato (5HV) dependendo do tipo de substrato fornecido (Kocer et al., 2003). A Tabela 5 apresenta substratos relacionados à produção de diferentes tipos de PHAs por *C. necator*.

O processo de produção de PHAs em *C. necator* é realizado em duas etapas. No início do processo, o meio contém todos os nutrientes necessários para a multiplicação celular, até alcançar uma quantidade de biomassa desejada. Na segunda fase, devido à exaustão de um nutriente essencial (geralmente nitrogênio ou fósforo), a bactéria passa a acumular o excesso de carbono na forma de biopolímeros.

Diversos estudos foram realizados a fim de se diminuir o custo de produção dos PHAs utilizando *C. necator* como microrganismo produtor. Marangoni e colaboradores (2000; 2001; 2002) estudaram *C. necator* DSM 545 em frascos agitados, testando lactose hidrolisada, galactose, frutose, glicose e açúcar invertido. O crescimento celular em açúcar invertido, glicose e frutose foi semelhante, obtendo-se nestas fontes de carbono as maiores velocidades específicas de crescimento. Também foi testada água de maceração de milho sob diferentes temperaturas (30 e 34°C), sugerindo-se a mesma como alternativa viável como substituinte da fonte de nitrogênio sintética. Squio e colaboradores (2003) utilizaram suplementos para a produção de PHBV e observaram que a adição de ácido linoléico/oléico (2:1) aumentou em 11% a produção do copolímero.

Tabela 5 - Substratos utilizados na produção de poliésteres por *Cupriavidus necator*.

Substrato	PHA obtido
Glicose, frutose, sacarose, ácido butírico, ácido acético, ácido D-glucônico, ácido adípico, ácido láctico, ácido málico, ácido cítrico, ácido fenil-acético, alanina, fenilalanina, ácido 4-hidróxi-hexanóico, óleo de palma, ácido oléico, glicose+etileno glicol	PHB
Glicose + propionato, ácido pentanóico + ácido butírico, ácido acético + propionato, ácido oléico + ácido nonanóico	PHBV
Ácido 4-hidróxi-butírico, $\gamma$ -butirolactona, $\gamma$ -butirolactona + frutose (ou ácido butírico), 4-cloro-butirato, 1,4 butanodiol, 4-cloro-benzoato + benzoato	P(3HB-co-4HB)
5-cloro-benzoato, 5-cloro-benzoato + pentanoato, 5-cloro-pentanoato + ácido pentanóico	P(3HB-co-3HV-co-5HV)

Fonte: Adaptado de Kocer et al., 2003.

### 3.2.3.2 *Escherichia coli* recombinante

A produção de PHAs em *E. coli* vem sendo amplamente pesquisada. Devido ao fato de que a fisiologia, a bioquímica e os aspectos genéticos da *E. coli* terem sido estudados em detalhes, isto tornou esta bactéria o hospedeiro perfeito para a expressão de genes heterólogos. Algumas vantagens são: (i) muitos plasmídeos e cepas mutantes estão disponíveis para manipulação; (ii) metodologias recombinantes e estratégias de cultivo em alta densidade celular já estão bem estabelecidas para a *E. coli*; (iii) a *E. coli* cresce rapidamente e oferece um ambiente bem-definido fisiologicamente para a construção e manipulação de várias vias metabólicas para a produção de uma grande variedade de PHAs; (iv) o acúmulo de uma grande quantidade de polímero, superior a 90% da massa celular seca, torna as células frágeis, facilitando o isolamento e purificação dos produtos; (v) a *E. coli* não possui despolimerases, impedindo a degradação do polímero formado; e (vi) dispensa a necessidade de limitação nutricional, apresentando crescimento celular e acúmulo de polímero simultâneos (Choi e Lee, 1999a; Sudesh et al., 2000; Mahishi et al., 2003; Li et al., 2007).

A produção de biopolímeros em *E. coli* requer a transferência dos genes de síntese de PHAs do organismo estudado, a expressão e ativação da proteína PHA sintase e a engenharia das vias metabólicas que fornecem os substratos necessários para a síntese do polímero (Steinbüchel e Lutke-Eversloh, 2003).

Utilizando técnicas de engenharia genética, muitos grupos desenvolveram e otimizaram *E. coli* contendo genes de biossíntese de PHAs que conseguem acumular mais de 90% de sua massa celular, obtendo conteúdos de PHAs e produtividades, respectivamente, da ordem de 73% e  $4,63 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (Choi et al., 1998), 78,2% e  $2,88 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (Choi e Lee, 1999b), e 87% e  $4,70 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (Ahn et al., 2001).

Agus e colaboradores (2006) expressaram as PHA sintases dos tipos I a IV em *E. coli* JM109 sob as mesmas condições experimentais e verificaram que as massas moleculares e a polidispersividade dos PHBs produzidos foram dependentes do tipo de PHA sintase empregada. A modificação das condições do meio, fonte de carbono e pH durante o cultivo pouco influenciou a massa molecular do PHB sintetizado pela sintase do tipo I, enquanto a variação da temperatura ( $30^\circ\text{C}$  para  $37^\circ\text{C}$ ) afetou fortemente o polímero obtido, aumentando a sua massa molecular.

### 3.2.3.3 Outros organismos produtores de PHAs

Apesar de a *C. necator* ser uma das melhores linhagens para a produção de PHAs a partir de substratos simples, diversos outros organismos foram estudados, incluindo *A. latus*, *A. vinelandii*, *P. extorquens*, *M. organophilum*, *P. oleovorans*, *B. cepacia* e outros microrganismos (Tabela 4).

*A. latus* foi um dos primeiros microrganismos estudados para a produção de PHAs devido ao fato de ela crescer rapidamente e conseguir acumular os polímeros durante a sua fase de crescimento, utilizando como fonte de carbono sacarose e melão de cana-de-açúcar. Wang e Lee (1997) testaram a produção de PHAs em batelada limitando a quantidade de nitrogênio, obtendo um acúmulo de 88% de polímero e produtividade de  $4,94 \text{ g}_{\text{PHB}} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

*P. oleovorans* é uma das bactérias capazes de sintetizar PHAs com cadeia média ( $\text{PHA}_{\text{MCL}}$ ), acumulando uma quantidade relativamente elevada de polímeros (Lee, 1996a). Diversos substratos foram testados, obtendo-se PHAs com cadeias laterais contendo grupos

alquílicos saturados, grupos insaturados, grupos fenílicos, grupos ramificados e grupos halogenados (Kocer et al., 2003).

*B. cepacia* foi utilizada para a síntese do copolímero PHBV utilizando como fonte de carbono ácido butírico e/ou ácido valérico (Mitomo et al., 1999). Cepas de *Burkholderia* isoladas a partir de amostras de solo acumularam blendas consistindo de uma mistura dos homopolímeros poli(3-hidroxi butirato) e poli(3-hidroxi butirato-4-pentenoato) (P(3HB4PE)) (Da Silva, 2001). *Burkholderia sacchari*, cultivada com ácidos valérico e propiônico, álcool isopropílico e ácido nonanóico, acumulou principalmente unidades de PHB e PHV, com traços de 3-hidroxiexanoato, 5-hidroxi valerato, 4-hidroxi valerato e 4-hidroxi butirato (Buffoni et al., 2005).

### 3.2.3.4 Plantas geneticamente modificadas

Diferentemente dos processos utilizados para a incorporação de PHAs em bactérias (ambiente estéril, oxigênio, agitação), a produção de biopolímeros em plantas utiliza como fonte de carbono o CO<sub>2</sub> e a luz solar como energia, permitindo a diminuição dos custos de produção. A produção de PHAs em escala agrônômica aumentaria a síntese dos biopolímeros para milhões de toneladas, sendo infinitamente vantajosa quando se compara à produção por processos fermentativos. Potencialmente, os PHAs poderiam ser produzidos a um custo de US\$ 0,20 a 0,50/kg, caso fossem sintetizados por plantas a uma porcentagem variando entre 20 a 40% de seu peso seco, podendo competir com os plásticos oriundos do petróleo. Por estas razões, espera-se que a produção de poli-hidroxi alcenoatos por plantas geneticamente modificadas seja uma forma de tornar competitiva economicamente a produção de PHAs (Valentin et al., 1999; Reddy et al., 2003; Suriyamongkol et al., 2007).

*Arabidopsis thaliana* foi a primeira planta escolhida para estudos da expressão dos genes de biossíntese de PHAs. Como a enzima 3-cetoacil-CoA tiolase está presente na *A. thaliana*, somente os genes *phaB* e *phaC* de *C. necator* foram inseridos na planta, o que resultou em acúmulo de grânulos de PHB no citoplasma, vacúolo e núcleos, afetando porém o crescimento da planta. A expressão de todos os genes *phaCAB* no plastídeo de *A. thaliana* melhorou o sistema de produção. O máximo acúmulo de PHAs foi de 14% em peso seco (Poirier, 2002).

As plantas oleaginosas são interessantes para a síntese de PHAs, visto que o PHB e o óleo são derivados do acetil-CoA. Estratégias



utilizando engenharia metabólica podem ser empregadas para deslocar o acetil-CoA apenas para a produção de PHB, diminuindo a produção de óleo. Outras plantas testadas para produção de PHAs são *Gossypium hirsutum* (algodão), *Zea mays* (milho) e *Nicotiana tabacum* L. (Tabaco). Empresas como Monsanto (USA) e Zeneca (UK) estão investindo em estudos para produção de PHAs a partir de plantas como a soja (Poirier, 2002; Reddy et al., 2003; Suriyamongkol et al., 2007).

### 3.2.4 Metabolismo de síntese dos PHAs

Podemos classificar as bactérias que acumulam poli-hidroxicanoatos em 2 grupos dependendo da composição dos monômeros. O primeiro grupo, representado pela *C. necator*, sintetiza PHB a partir do acetoacetil-CoA; enquanto *P. aeruginosa*, integrante do segundo grupo, utiliza o metabolismo dos ácidos graxos para a síntese de PHAs, via beta-oxidação dos ácidos graxos ou metabolismo *de novo* de ácidos graxos (Figura 6) (Steinbüchel e Lutke-Eversloh, 2003).

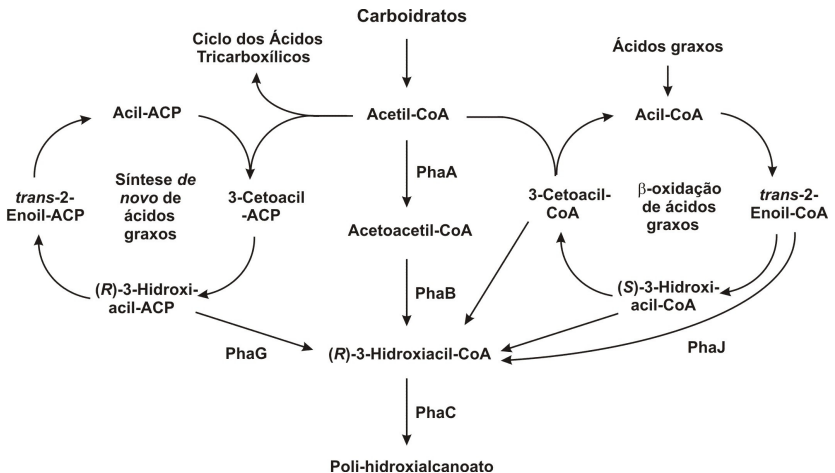


Figura 6 - Biossíntese de poli-hidroxicanoatos no contexto do metabolismo microbiano. PhaA, 3-cetotiolase; PhaB, (R)-3-cetoacil-CoA redutase (para biossíntese de PHB, esta enzima é a acetoacetil-CoA redutase); PhaC, PHA sintase ou polimerase; PhaG, (R)-3-hidroxiacil ACP:CoA transacilase; PhaJ, (R) enoil-CoA hidratase.

Os genes de biossíntese de PHAs são arranjados em vários *clusters* em diferentes bactérias. Entretanto, apesar das sequências das enzimas serem bastante conservadas entre as espécies, o número de genes envolvidos e a disposição dos mesmos nos *operon* diferem significativamente (Madison e Huisman, 1999; Rehm e Steinbüchel, 1999). Enquanto em *C. necator* eles formam um *operon*, em outros microrganismos podem estar dispersos pelo genoma.

A via bioquímica para a síntese de PHAs tem sido estudada em nível molecular, com particular interesse na enzima poli-hidroxiacanoato sintase (PHA sintase), a qual catalisa passo chave desta via. Os genes envolvidos na biossíntese de PHAs de várias bactérias foram clonados e analisados em nível molecular (Steinbüchel e Schlegel, 1991; Steinbüchel et al., 1992).

Atualmente, a *C. necator* é considerada o organismo modelo para o estudo do metabolismo dos PHAs de cadeia curta, sendo que as rotas metabólicas, enzimas e genes envolvidos na sua biossíntese já foram bem caracterizados e definidos. A via de biossíntese de PHB a partir de acetil-CoA consiste de três reações enzimáticas envolvendo as enzimas  $\beta$ -cetotiolase (PhaA), NADPH-dependente acetoacetil-CoA redutase (PhaB) e PHA sintase (PhaC) codificadas pelos genes *phbA*, *phbB* e *phbC* agrupados em um *operon* (*phbCAB*) (Figura 7).

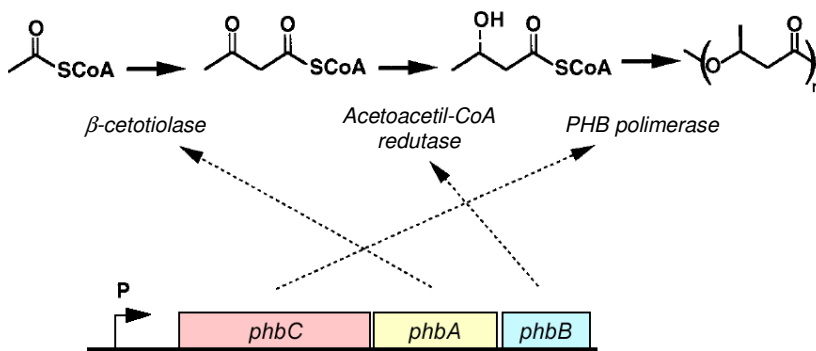


Figura 7 - Biossíntese de poli-hidroxi-butarato (PHB) em *Cupriavidus necator*. São destacadas as enzimas envolvidas e a organização dos genes no *operon* (Madison e Huisman, 1999).

A PHA sintase (*phbC*) possui uma baixa especificidade, podendo incorporar diversos precursores, como por exemplo, 3-hidroxi-butiliril-CoA, 3-hidroxi-propionil-CoA, 3-hidroxi-valeril-CoA, bem como 4-hidroxi-butiliril-CoA. Quando o tipo de substrato utilizado permite ao metabolismo a formação de 3-hidroxi-valeril-CoA, tem-se a formação do copolímero PHBV. A fração de 3HB e 3HV no copolímero pode ser manipulada alterando a concentração de propionato ou de glicose no meio de cultura (Li et al., 2007).

Quando glicose é o único substrato carbônico utilizado para a produção de PHAs, este é metabolizado até unidades de acetil-CoA. Duas moléculas de acetil-CoA condensam-se, por atividade de uma  $\beta$ -cetotiolase específica, produzindo acetoacetil-CoA. Este último composto é reduzido, por atividade de uma redutase dependente de NADPH a 3-hidroxi-butiliril-CoA, o qual é substrato para a enzima de polimerização, PHA sintase, produzindo o PHB. No entanto, se propionato ou valerato (ou outro substrato de 3 ou 5 carbonos) é utilizado como um co-substrato, propionil-CoA ou valeril-CoA é produzido através da atividade da enzima acil-CoA sintase. O propionil-CoA pode ser convertido em cetovaleril-CoA através da atividade da  $\beta$ -cetotiolase, que o condensa a uma unidade de acetil-CoA. O cetovaleril pode ser reduzido a 3-hidroxi-valeril-CoA e este utilizado pela polimerase para produzir copolímeros PHBV, como esquematizado na Figura 8 (Anderson e Dawes, 1990; Doi et al., 1990).

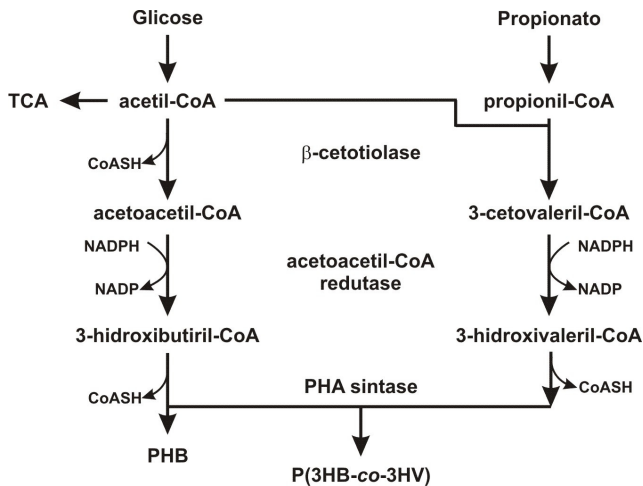


Figura 8 - Esquema da via de biossíntese de PHB e de PHBV a partir de glicose e propionato (Doi, Kanesawa et al., 1990).

Aproximadamente 60 diferentes PHA sintases de 45 organismos diferentes foram isoladas e caracterizadas (Rehm, 2003). Baseados na especificidade ao substrato e na composição das subunidades enzimáticas, as PHA sintases são classificadas em quatro tipos. PHA sintases dos tipos I e II são formadas por uma única subunidade (PhaC) com massa molecular entre 61 e 73 kDa. As PHA sintases do tipo I são específicas para monômeros de ácidos hidroxialcanóicos de cadeia curta (C3-C5), incluindo como representante deste grupo a PHA sintase de *C. necator* (Slater et al., 1988).

O tipo II inclui PHA sintases de *P. oleovorans* e *P. aeruginosa*, ambas catalisando a polimerização de monômeros de ácidos hidroxialcanóicos de cadeia média, contendo de 6 a 14 átomos de carbono (Huisman et al., 1991).

PHA sintases do tipo III são encontradas nas bactérias *Allochromatium vinosum* e *Thiocapsa violaceae*. Estas bactérias possuem a mesma especificidade para substratos que a enzima do tipo I, apesar de se diferenciarem em sua estrutura primária. A enzima possui duas subunidades. A subunidade PhaC, com massa molecular de aproximadamente 40 kDa, apresenta similaridade de 21 e 28% com os tipos I e II, e a subunidade PhaE, com massa molecular de aproximadamente 40 kDa, não apresenta nenhuma similaridade com PHAs sintases. Como são similares ao tipo I, estas PHA sintases preferem polimerizar monômeros de cadeia curta (C3 e C5) (Liebergesell et al., 2000).

As PHAs sintases do tipo IV, representadas por *Bacillus megaterium*, são parecidas com as PHAs sintases do tipo III, ocorrendo a troca da subunidade PhaE por uma subunidade PhaR, com massa molecular de aproximadamente 20 kDa (Mccool e Cannon, 2001).

Em *C. violaceum*, a expressão dos genes *phaC* (PHA sintase) e *phaA* ( $\beta$ -cetotiolase), que pertencem a um *operon*, e do gene *phaB* (acetacetil-CoA redutase), que ocorre isoladamente no genoma, permite a biossíntese de polímeros hidroxialcanóicos de cadeia curta. O copolímero PHBV é sintetizado utilizando unicamente glicose como fonte de carbono, enquanto o homopolímero poli-3-hidroxivalerato (PHV) utiliza ácido valérico como único precursor (Steinbüchel et al., 1993; Kolibachuk et al., 1999; Viegas, 2005).

As tentativas de construir uma *E. coli* recombinante contendo o gene *phaC* de *C. violaceum* apresentaram uma produção insignificante de polímero (Kolibachuk et al., 1999; Piemolini, 2004). Bressan (2007), realizando estudos *in silico* com a *C. violaceum*, propôs uma abordagem diferente para a clonagem do gene PHA sintase em *E. coli*

recombinante. Ensaios experimentais realizados apresentaram resultados promissores em relação aos estudos anteriores. A Figura 9 apresenta a modelagem por homologia da PHA sintase de *C. violaceum* realizada por Bressan (2007), apresentando em destaque a tríade catalítica formada pela cisteína (C315), aspartato (D471) e histidina (H501).

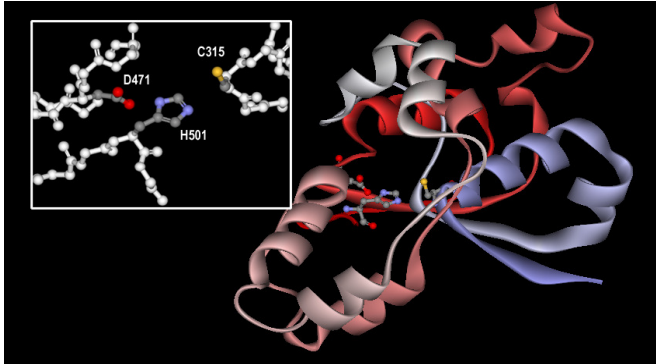


Figura 9 - Modelo proposto para a poli-hidroxicanoato sintase (PhaC) de *Chromobacterium violaceum*. A tríade catalítica é apresentada no detalhe (Bressan, 2007).

### 3.2.4.1 Proteínas associadas aos grânulos de PHAs

Geralmente, os PHAs são encontrados dispersos no citoplasma, acumulados como inclusões dentro da célula. Os grânulos possuem natureza hidrofóbica, sendo delimitados por um complexo formado por uma camada simples de fosfolipídios e proteínas associadas à síntese e degradação do polímero ou à estabilização do grânulo, evitando a sua coalescência com grânulos vizinhos. Os poli-hidroxicanoatos *in vivo* possuem natureza amorfa e fluida, tornando-se altamente cristalino após a sua extração com solventes orgânicos (Madison e Huisman, 1999; Sudesh et al., 2000). A Figura 10 apresenta a organização estrutural de um grânulo de PHAs.

Quatro tipos de proteínas são encontradas associadas aos grânulos de PHAs durante a sua síntese (Potter e Steinbüchel, 2005): PHA sintase, PHA despolimerase (PhaZ) e 3HB-oligômero hidroxilase, fasininas (PhaPs) e fator de transcrição R (PhaR).

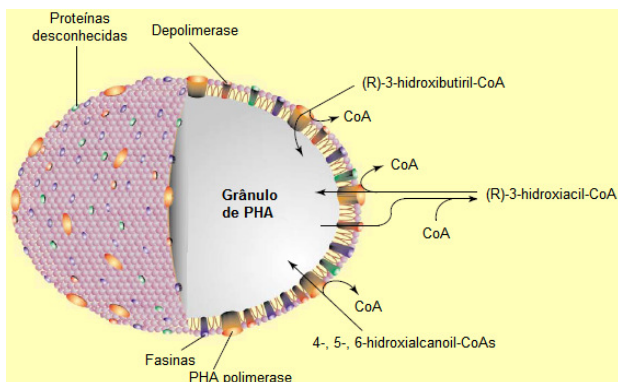


Figura 10 - Organização estrutural dos grânulos e moléculas envolvidas na biossíntese e no catabolismo de poli-hidroxiacanoatos (modificado de Luengo et al., 2003).

A PhaZ é uma PHA despolimerase intracelular, responsável pela degradação do polímero para sua utilização como fonte de energia e carbono. Encontra-se na superfície do grânulo e possui atividade somente sobre os PHAs no estado amorfo, sendo inativa sobre o polímero na sua forma cristalina (Sudesh et al., 2000; Stubbe et al., 2005). A síntese de polímeros com elevada massa molecular em *E. coli* pode estar diretamente associada a ausência de PhaZ neste microrganismo.

Potter e colaboradores (2004) demonstraram a ocorrência de quatro tipos diferentes de Fasinas em *C. necator*: PhaP1, PhaP2, PhaP3 e PhaP4. A proteína predominante é a PhaP1, cobrindo cerca de 30% da superfície do grânulo, enquanto as proteínas PhaP2, PhaP3 e PhaP4 ocorrem em concentrações muito baixas. A PhaP1 não apresenta atividade enzimática, possuindo importante função na estabilização da estrutura dos grânulos intracelulares, evitando a coalescência entre grânulos vizinhos. Os níveis de expressão da PhaP1 determinam o número e tamanho dos grânulos formados, havendo uma relação inversa entre os níveis de expressão da PhaP1 e o tamanho dos grânulos (Potter e Steinbüchel, 2005). Por exemplo, enquanto *C. necator* possui entre 8 e 12 grânulos de diferentes tamanhos, *P. oleovorans* possui apenas 1 ou 2 grânulos grandes (Rehm, 2003).

### 3.2.5 Aplicações dos PHAs

Biomateriais são produtos naturais sintetizados e catabolizados por diferentes microrganismos e que podem ser utilizados em uma grande quantidade de aplicações biotecnológicas. Eles podem ser degradados (assimilados) por muitas espécies (biodegradáveis) e não causam efeitos tóxicos no hospedeiro (biocompatíveis) (Steinbüchel e Fuchtenbusch, 1998; Angelova e Hunkeler, 1999; Zinn et al., 2001). Estas propriedades conferem aos biomateriais uma vantagem considerável sobre outros produtos sintéticos convencionais.

Devido às inúmeras características dos poli-hidroxialcanoatos, como por exemplo, sua biodegradabilidade, e de serem sintetizados a partir de fontes renováveis de carbono, estes biomateriais foram inicialmente utilizados como uma alternativa aos materiais preparados a partir de plásticos de origem petroquímica (Madison e Huisman, 1999; Steinbüchel e Lutke-Eversloh, 2003; Stubbe et al., 2005).

As principais aplicações propostas inicialmente para estes polímeros consistiam na manufatura de produtos biodegradáveis para diferentes setores, por exemplo, como garrafas, filmes e fibras para embalagens de cosméticos e outros produtos; como coberturas plásticas na agricultura; como filmes para revestimento de papel e fios; e como produtos com ciclo de vida curta – barbeadores, fraldas, copos e talheres plásticos (Steinbüchel e Fuchtenbusch, 1998).

No entanto, por serem polímeros biocompatíveis e não tóxicos, podendo ser facilmente absorvidos e metabolizados pelo organismo, os PHAs têm demonstrado uma larga aplicabilidade também na área médica (Tabela 6). Diversas aplicações têm sido testadas utilizando estes biopolímeros como matéria-prima para a fabricação de materiais utilizados em intervenções cirúrgicas e outros procedimentos, incluindo próteses ósseas e substratos para o desenvolvimento celular *in vitro* e *in vivo*, além de fios de sutura e material para reconstituição de vasos sanguíneos (Zinn et al., 2001).

Os PHAs podem atuar também como carreadores biodegradáveis para liberação gradual de diversos fármacos, medicamentos, hormônios, inseticidas e herbicidas (Reddy et al., 2003). A utilização de PHAs para liberação gradual de antibióticos é particularmente útil no controle de infecções e formação de biofilmes que podem ocorrer em implantes de próteses (Rossi et al., 2004). Estes biomateriais, nestes casos, podem ser utilizados como um revestimento biodegradável da prótese, impedindo o estabelecimento de infecções e a formação de biofilmes durante a regeneração dos tecidos envolvidos e da fixação da prótese.

Tabela 6 - Aplicações potenciais dos PHAs na medicina.

<b>Tipo de aplicação</b>	<b>Produtos</b>
Tratamento de ferimentos	suturas, substitutos de pele, nervos, malhas cirúrgicas, grampos
Sistema vascular	válvulas cardíacas, estruturas cardiovasculares, ataduras pericárdicas, enxertos vasculares
Ortopedia	estruturas para cartilagens, suporte espinhal, enxertos ósseos, regeneração do menisco, fixação de dispositivos internos (ex. parafusos)
Disposição controlada de fármacos	micro e nanoesferas para terapia anti-câncer
Urologia	próteses ( <i>stents</i> ) urológicos
Odontologia	material de barreira para regeneração de tecidos em periodontite
Ultrassom e tomografia computadorizada	agentes de contraste

Fonte: Adaptado de Zinn et al., 2001.

Os PHAs possuem várias características que os tornam um material superior quando comparados aos demais materiais atualmente utilizados para este propósito. A taxa de liberação de antibióticos, por exemplo, pode ser parcialmente controlada através da manipulação da composição monomérica do polímero. Além destas aplicações, alguns monômeros apresentam ainda um potencial terapêutico. O monômero que se destaca para estas aplicações é o 4-hidroxitubirato (4HB) encontrado em alguns polímeros e também conhecido como  $\gamma$ -hidroxitubirato (GHB) (Sudesh et al., 2000). O 4HB é utilizado como agente anestésico intravenoso na Europa e Japão, como auxiliar no tratamento da narcolepsia e, mais recentemente, também sugerido para o tratamento das síndromes de abstinência de álcool após a descoberta de que o 4-HB aumenta os níveis cerebrais de dopamina. Recentemente, TephaFLEX<sup>®</sup>, uma sutura reabsorvível baseada no poli(4-hidroxitubirato), foi aprovada pelo FDA (*US Food and Drug Administration*) para aplicações clínicas (Li et al., 2008).



A obtenção de nanopartículas de PHAs a partir da extração dos grânulos também foi recentemente descrita (Potter e Steinbüchel, 2005). Diferentes substâncias poderiam ser ligadas a estas nanopartículas através da fusão com as fasinas, como medicamentos e outros fármacos, anticorpos, antígenos e marcadores diversos. Estas fusões poderiam ser obtidas pela tecnologia do DNA recombinante, enzimaticamente ou através de reações químicas. Em *C. necator* e outras bactérias, a manipulação da expressão da proteína PhaP (fasina) durante a síntese do polímero permitiria ainda um controle do tamanho das nanopartículas, já que estas proteínas tem demonstrado importante função na determinação do tamanho dos grânulos formados.

A fim de estabelecer sistemas de produção de PHAs econômicos e obter biopolímeros a partir de fontes baratas de carbono, de preferência a partir de fontes renováveis, CO<sub>2</sub> e resíduos; esforços têm sido realizados para estabelecer novas vias em organismos procarióticos e eucarióticos recombinantes. Isto requer transferência de um gene estrutural da PHA sintase, expressão de uma proteína PHA sintase ativa e estabelecimento de vias que proporcionem esta PHA sintase ativa e substratos em concentrações suficientes. Somente se estes três aspectos forem satisfeitos a via metabólica de produção de PHAs será expressa e permitirá a biossíntese destes polímeros a partir de intermediários centrais e assim, a produção a partir de fontes renováveis de carbono ou até mesmo CO<sub>2</sub> (Steinbüchel e Lutke-Eversloh, 2003).



## 4.1 - Microrganismo

O microrganismo utilizado neste estudo foi a *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, linhagem sequenciada pelo projeto Genoma Brasileiro. A linhagem era mantida em meio Luria-Bertani (LB), composto de 10 g·l<sup>-1</sup> de peptona de carne, 5 g·l<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 5 g·l<sup>-1</sup> de cloreto de sódio, contendo 20% de glicerol, a -80 °C. Quando de sua utilização, uma alçada do meio armazenado era transferida por esgotamento para uma placa de Petri contendo meio ágar-LB.

## 4.2 - Produção de poli-hidroxialcanoatos

### 4.2.1 Estudos em agitador orbital (*shaker*)

A produção de PHAs em *C. violaceum* foi estudada sob limitação de nitrogênio e de fósforo variando-se o pH (6 e 7), a concentração de glicose (10, 20 e 30 g·l<sup>-1</sup>) e a concentração de propionato (0, 5, 10 e 15 mM) como precursor de unidades de valerato. Os experimentos foram realizados em duplicata utilizando temperatura (30°C) e velocidade de agitação (2,5 Hz) constantes, totalizando 96 ensaios.

O meio mineral (MM) utilizado nos experimentos foi baseado em Aragão e colaboradores (1996). A Tabela 7 apresenta a composição do meio mineral, enquanto a Tabela 8 apresenta a composição da solução concentrada de elementos traço. Nos experimentos, para a limitação em nitrogênio utilizou-se 2,3 g·l<sup>-1</sup> de sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), sendo que as outras concentrações do MM mantiveram-se constantes, enquanto que para a limitação em fósforo utilizaram-se 0,34 g·l<sup>-1</sup> de fosfato dibásico de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e 0,15 g·l<sup>-1</sup> de fosfato monobásico de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Foram preparadas soluções de glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) 25% (m/v), de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) 0,1 M e de ácido propiônico (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) 0,1 M (neutralizada a pH 7 com hidróxido de sódio

(NaOH) 10 M). Todas as soluções utilizadas nos experimentos, incluindo o meio mineral, foram autoclavadas a 121°C durante 20 minutos.

A etapa de pré-cultura foi realizada transferindo-se uma colônia de *C. violaceum* para um frasco Erlenmeyer de 125 ml contendo 30 ml de meio LB, que foi agitado durante 24 h a 2,5 Hz e 30°C. O inóculo foi preparado em frasco Erlenmeyer de 500 ml utilizando o MM descrito na Tabela 7, ao qual foram acrescentados 10 ml da pré-cultura, 30 g·l<sup>-1</sup> de glicose 25% (m/v) e 0,5 g·l<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio 0,1 M, de modo a se obter um volume final de inóculo de 100 ml.

Tabela 7 - Composição do meio mineral utilizado nos experimentos em agitador orbital e biorreator de bancada.

Reagentes	Concentração
Ácido nitrilotriacético [N(CH <sub>2</sub> COOH) <sub>3</sub> ]	0,19 g·l <sup>-1</sup>
Citrato ferroso de amônio [Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> ]	0,06 g·l <sup>-1</sup>
Cloreto de cálcio diidratado [CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O]	0,01 g·l <sup>-1</sup>
Fosfato dibásico de sódio [Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ]	3,54 g·l <sup>-1</sup>
Fosfato monobásico de potássio [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	0,01 g·l <sup>-1</sup>
Sulfato de amônio [(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	5,00 g·l <sup>-1</sup>
Solução de elementos traço	1,00 ml·l <sup>-1</sup>

Tabela 8 - Composição da solução concentrada de elementos traço utilizada nos experimentos em agitador orbital e biorreator de bancada.

Elementos traço	Concentração (g·l <sup>-1</sup> )
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,30
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,20
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,10
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,03
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,03
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,02
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,01

O pH do meio mineral foi corrigido utilizando-se hidróxido de sódio (NaOH) 2M e ácido clorídrico (HCl) 1M. Este meio foi incubado a 30°C e 2,5 Hz durante 24 horas. Os meios de cultura foram preparados em frascos Erlenmeyer de 100 ml contendo um volume final de 30 ml.

Após 48 horas de cultivo a 30°C e 2,5 Hz, 4,5 ml do meio de cultura foi centrifugado em micro-tubos a 11000·g durante 15 minutos a 4°C em centrífuga Hitachi modelo HIMAC CR 20B2. O precipitado foi ressuspenso com água destilada e centrifugado duas vezes para lavagem, seguido de secagem em estufa a 50°C até peso constante. Este procedimento foi realizado em triplicata, de modo a se obter uma maior precisão nos resultados obtidos. A percentagem de acúmulo de PHAs, bem como sua caracterização, foi realizada por cromatografia gasosa, conforme descrito na seção Técnicas analíticas, item 4.4.

#### 4.2.2 Estudos em biorreator de bancada

Os estudos em escala de bancada para a produção e caracterização dos PHAs foram realizados em um biorreator de sete litros BioFlo 110 (New Brunswick Scientific Co., Edison NJ), com volume de trabalho de quatro litros (Figura 11), localizado no Laboratório de Tecnologias Integradas - IntelAB, da Universidade Federal de Santa Catarina.

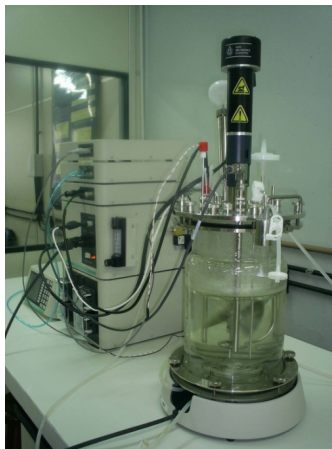


Figura 11 - Biorreator de bancada BioFlo 110, com volume de trabalho de quatro litros e controle de temperatura, pH e agitação.

Na Tabela 9 estão resumidas as condições experimentais utilizadas nos experimentos para a produção de poli-hidroxiacanoatos em *C. violaceum* a 20°C e pH 7.

Tabela 9 - Condições utilizadas nos experimentos em biorreator de bancada para produção de PHAs em *Chromobacterium violaceum* com pH 7 e concentração de glicose de 20 g·l<sup>-1</sup>.

Experimento	Limitação	Concentração de propionato (mM)
1	N	0
2	N	10
3	P	0
4	P	10

O pré-inóculo foi preparado inoculando-se três alçadas da cepa de *C. violaceum* mantida em meio ágar-LB em um frasco Erlenmeyer de 125 ml contendo 40 ml de meio LB. O frasco foi incubado a 30°C sob agitação de 2,5 Hz durante 24 h.

O inóculo foi preparado em frasco Erlenmeyer de 1000 ml utilizando o meio mineral (MM) descrito na Tabela 7. Para se obter um volume final de 400 ml de inóculo, foram adicionados 40 ml do pré-inóculo, 48 ml de glicose 25% (m/v) e 8 ml de sulfato de magnésio 0,1 M a 304 ml do meio mineral. O pH do meio foi corrigido para 7 utilizando-se HCl 1M e NaOH 1 M. Este meio foi incubado a 30°C e 2,5 Hz durante 30 horas.

O biorreator contendo o MM foi autoclavado a 121°C durante 20 minutos e o inóculo e as soluções de glicose e sulfato de magnésio foram adicionadas asépticamente. Durante a cultura a temperatura foi mantida constante em 30°C e o pH ajustado a 7 com soluções de NaOH 10% (m/v) e HCl 10% (v/v). Como antiespumante foi utilizado polipropilenoglicol (Sigma-Aldrich). As condições iniciais de agitação e aeração foram de 7,0 Hz e 0,5 l·min<sup>-1</sup> respectivamente, aumentando gradualmente até 14 Hz e 1,5 l·min<sup>-1</sup>, de modo a manter a concentração de oxigênio dissolvido sempre superior a 30%.

Durante os experimentos, em intervalos de duas horas, foram retiradas amostras de aproximadamente 20 ml. Desta amostra, 14 ml foram divididos em sete microtubos de 2 ml, que foram centrifugados a 10000·g durante cinco minutos. O sobrenadante foi guardado em outros

três microtubos e congelado para a realização de análises posteriores. O precipitado foi lavado duas vezes com água destilada, sendo o sobrenadante descartado. Metade dos micro-tubos foi utilizada para a determinação da concentração de biomassa e a outra metade dos micro-tubos foi congelada para posterior análise do polímero. As Técnicas analíticas estão descritas no item 4.4.

### **4.3 - Extração e preparação dos filmes de PHAs**

#### **4.3.1 Extração dos poli-hidroxicanoatos**

A extração foi realizada seguindo o método desenvolvido por Shishatskaya e Volova (2004). Aproximadamente cinco gramas de biomassa seca, macerada e triturada, foram colocadas em um balão de fundo redondo com aproximadamente 250 ml de etanol 46% (v/v) contendo  $0,7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de KOH. A solução foi aquecida até o ponto de ebulição por aproximadamente 40 minutos em um condensador. Após, o balão foi retirado do condensador para a decantação do material sólido. O sobrenadante foi removido por centrifugação (7000-g, dez minutos) e 250 ml de etanol 96% (v/v) foram adicionados ao precipitado para lavagem. A solução foi novamente centrifugada para retirada do líquido de lavagem. O precipitado foi transferido para um balão de fundo redondo, ao qual foram adicionados 250 ml de clorofórmio. A solução foi aquecida até o ponto de ebulição em um condensador. Após aproximadamente 40 minutos, a solução foi resfriada à temperatura ambiente e filtrada com algodão para retirada do material sólido. Ao filtrado foi acrescentado aproximadamente três vezes o seu volume de etanol 96% (v/v) e colocado em geladeira por 24 horas. A mistura foi filtrada, deixando o papel filtro secar durante três dias.

#### **4.3.2 Preparação dos filmes de PHAs**

Para a preparação dos filmes de PHBV para análise através de microscopia eletrônica de varredura, o material foi extraído da biomassa de *C. violaceum* obtida em biorreator BioFlo 110. O ensaio foi realizado com limitação de nitrogênio, pH 7,  $30^\circ\text{C}$ ,  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicose e sem a adição de propionato como co-substrato. O polímero obtido do processo de extração da biomassa seca foi solubilizado em clorofórmio P.A., na razão de 2% (m/v), sendo a solução mantida em agitação até a completa

dissolução do material. A solução foi então vertida em uma placa de vidro, sendo mantida em estufa a temperatura de 40°C por 24 horas para a completa evaporação do solvente. Os filmes assim preparados foram armazenados para posterior caracterização.

#### **4.4 - Técnicas analíticas**

##### **4.4.1 Determinação da concentração de biomassa**

A concentração celular foi obtida por gravimetria a partir da diferença de massa de um microtubo de 2 ml. O microtubo foi seco em estufa a 90°C por 24 h. Após a centrifugação de 2 ml da amostra, o microtubo foi novamente seco em estufa a 90°C até massa constante. A diferença entre as massas do microtubo foi considerada como o valor da concentração da biomassa seca em cada amostra.

##### **4.4.2 Determinação da concentração de substrato**

A concentração de substrato no meio foi obtida pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), que determina a concentração de açúcares redutores presentes na amostra. O reativo foi preparado adicionando-se em água destilada 300 g de tartarato de sódio e potássio tetraidratado ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) e 16 g de hidróxido de sódio (NaOH). Após, 10 g de ácido dinitrosalicílico ( $\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$ ) foram adicionados muito lentamente, completando o volume para 1000 ml com água destilada.

Um volume de 1 ml de sobrenadante, previamente diluído, foi adicionado a 1 ml do reativo DNS e depois colocado em ebulição durante cinco minutos em banho-maria. Após esse período, fez-se o resfriamento em banho de gelo e adicionaram-se 8 ml de água destilada. Após 15 minutos em repouso para estabilização da temperatura, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Spectrum SP-1105, Shanghai Spectrum Instruments Co., China) a 540 nm contra um branco de água destilada que passou pelo mesmo procedimento. A curva padrão expressa a concentração de glicose ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ) em função da absorbância em uma escala compreendida entre 0 e  $3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  de glicose (Anexo I - Figura 36).



### 4.4.3 Dosagem de nitrogênio

Para a dosagem do nitrogênio foi utilizado o *kit* Ureia ES, um *kit* enzimático-colorimétrico (Gold Analisa - Brasil), que mede a quantidade de nitrogênio amoniacal do meio. Os reagentes utilizados foram: (1) Padrão: contendo ureia 50 mg·dl<sup>-1</sup>; (2) Tampão: contendo fosfato 20 mmol·l<sup>-1</sup> pH 6,9, salicilato de sódio 62 mmol·l<sup>-1</sup> e nitroprussiato de sódio 3,4 mmol·l<sup>-1</sup>; (3) Urease: contendo urease > 500 U·ml<sup>-1</sup>; e (4) Oxidante: contendo hidróxido de sódio 150 mmol·l<sup>-1</sup> e hipoclorito de sódio 7 mmol·l<sup>-1</sup>.

Para a melhor determinação dos valores, foi preparada uma curva padrão de nitrogênio em função da absorbância em uma escala compreendida entre 0,1 e 0,7 g·l<sup>-1</sup> de nitrogênio (Anexo I - Figura 37).

Para a realização do teste foram identificados dois tubos de ensaio como referência (R) e teste (T), procedendo-se conforme a Tabela 10.

Tabela 10 - Quantidade de reagente utilizado para análise de nitrogênio.

<b>Tubos</b>	<b>Referência (R)</b>	<b>Teste (T)</b>
Amostra	–	10 µL
Reagente de trabalho	1000 µL	1000 µL
Agitar e esperar 10 minutos		
Oxidante	1000 µL	1000 µL

Agitou-se e deixou-se repousar por dez minutos em temperatura ambiente. As absorbâncias do teste foram lidas em espectrofotômetro (Spectrum SP-1105, Shanghai Spectrum Instruments Co., Ltd – Shanghai, China) a 600 nm, ajustando-se o zero com a referência. A concentração de nitrogênio foi calculada em g·l<sup>-1</sup> com base na curva padrão, que foi construída seguindo o mesmo procedimento utilizado para o teste.

### 4.4.4 Dosagem de fósforo

Para a dosagem do fósforo foi utilizado um *kit* enzimático-colorimétrico (Gold Analisa - Brasil). Os reagentes utilizados foram: (1) Padrão de 5,0 mg·dl<sup>-1</sup>: contendo fosfato monobásico de potássio 220

$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , ácido clorídrico 1 M e azida sódica  $7,7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; (2) Redutor: contendo ácido ascórbico  $57 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  e glicerol 95%; (3) Molibdato: contendo molibdato de amônio  $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  e ácido sulfúrico  $1,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Foram identificados três tubos de ensaio como referência (B), teste (T) e padrão (P) e procedeu-se conforme a Tabela 11.

Tabela 11 - Quantidade de reagente utilizado para análise de fósforo.

Tubos	Referência (B)	Teste (T)	Padrão (P)
Padrão (1)	–	–	0,1 ml
Amostra	–	0,1 ml	–
Água destilada	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Redutor (2)	1 gota	1 gota	1 gota
Molibdato (3)	1 gota	1 gota	1 gota
Agitar e esperar 2 minutos			
Tampão (4)	2 gotas	2 gotas	2 gotas

Agitou-se e deixou-se repousar por cinco minutos em temperatura ambiente. As absorvâncias do teste e do padrão foram lidas em espectrofotômetro (Spectrum SP-1105, Shanghai Spectrum Instruments Co., Ltd – Shanghai, China) a 650 nm, ajustando-se o zero com a referência. A concentração de fósforo foi calculada em  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  multiplicando-se a absorvância lida pelo fator de correção calculado pela Equação 1.

$$\text{Fator de correção} = \frac{5 \text{ mg/dL}}{\text{absorvância do padrão a 650 nm}} \quad (1)$$

#### 4.4.5 Dosagem de poli-hidroxialcanoatos

A percentagem de acúmulo de PHAs, bem como sua caracterização, foi feita por cromatografia gasosa conforme método descrito por Brauneegg e colaboradores (1978), com as modificações propostas por Brandl e colaboradores (1988).

As amostras, com volume conhecido de meio de cultura, foram centrifugadas a  $10000\cdot\text{g}$  por cinco minutos. O precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e congelado para posterior análise. Após descongelamento, o precipitado foi ressuspensionado em 2 ml de uma

solução contendo 15% (v/v) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 85% (v/v) de metanol e ácido benzóico na concentração de 0,4 g·l<sup>-1</sup> como padrão interno, e 1 ml de clorofórmio. A suspensão foi aquecida em banho-maria a 100°C durante duas horas e 20 minutos, sendo que após a primeira hora de aquecimento a mistura foi agitada em agitador de tubos durante alguns segundos e recolocada no banho-maria. As amostras foram resfriadas durante dez minutos em banho de gelo. Após, foi adicionado 1 ml de água destilada às amostras, agitando cada amostra em agitador de tubos durante 30 segundos, deixando separar as fases. A fase inferior (orgânica) foi recolhida com auxílio de uma micropipeta e levada para análise em cromatógrafo gasoso (Shimadzu 2014), equipado com detector de ionização de chama (FID). Foi utilizada uma coluna de sílica fundida (Supelcowax-10/0,53 mm x 30 m). O gás de arraste foi nitrogênio a 20 ml·min<sup>-1</sup> e as temperaturas de injeção, de detecção e da coluna foram, respectivamente, 90°C, 230°C e 110°C. O volume de amostra injetado foi de 1 µl. A curva padrão foi construída utilizando o padrão P(3HB-co-3HV) 86% 3HB e 14% 3HV (Sigma), com a massa das amostras variando entre 2,0 e 30 mg, seguindo os mesmos procedimentos descritos para a análise dos pontos experimentais (Anexo I – Figuras 34 e 35).

As análises de cromatografia gasosa dos polímeros obtidos foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

## **4.5 - Caracterização dos biopolímeros**

### **4.5.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Permite uma caracterização rápida e precisa da superfície e das sub-estruturas porosas dos biopolímeros. A área a ser analisada é bombardeada por um feixe de elétrons, de intensidade variada. A interação do feixe de elétrons com a superfície da amostra emite uma série de radiações, que fornecem informações sobre a composição, topografia dos polímeros e detalhes de textura da superfície.

A análise foi realizada no Laboratório de Materiais do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Santa Catarina utilizando um equipamento Philips XL-30. A amostra foi preparada através da fratura em nitrogênio líquido dos filmes de PHAs. Os fragmentos da superfície de fratura foram fixados em suporte de

alumínio e receberam uma fina camada de ouro (aproximadamente 20 nm de espessura) utilizando-se um metalizador de amostras.

#### **4.5.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

No estudo dos polímeros, a Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) permite analisar os compostos presentes na estrutura dos mesmos e a interação entre eles. Exceto para isômeros ópticos, não se conhecem compostos com um mesmo espectro.

A amostra foi preparada prensando-se o polímero moído na forma de pastilha, juntamente com brometo de potássio (KBr).

A análise foi realizada na Central de Análises do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina utilizando um espectrômetro Bomem, modelo ABB FTLA200, na faixa de número de onda entre 400 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **4.5.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

É um tipo de análise térmica onde o fluxo de calor entre a amostra analisada e a amostra de referência é medido em função da temperatura e/ou tempo. A análise por DSC indica a modificação precisa da estrutura ao ser verificada sua variação de entropia por medidas calorimétricas de entalpia. Esta técnica permite determinar o grau de cristalinidade ( $\chi_C$ ), a temperatura de fusão ( $T_m$ ) e a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) da amostra.

A análise foi realizada na Central de Análises do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina utilizando um equipamento Shimadzu DSC50. As amostras, pesando entre 4,0 e 6,1 mg, foram seladas em panelas de alumínio sob atmosfera de argônio e aquecidas uma única vez (primeiro aquecimento) de -70°C a 200°C, com taxa de aquecimento de 10°C·min<sup>-1</sup>.

#### **4.5.4 Análise termogravimétrica (TGA)**

A Análise termogravimétrica (TGA) mede a variação de massa em função da temperatura em uma atmosfera controlada. É possível obter a estabilidade térmica dos polímeros, determinando temperatura

do início de degradação ( $T_i$ ), temperatura máxima de degradação ( $T_{\text{pico}}$ ) e a perda de massa da amostra.

A análise foi realizada na Central de Análises do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina utilizando o equipamento Shimadzu TGA50, sob atmosfera de argônio, sendo as amostras aquecidas de 20°C a 600°C a uma taxa de aquecimento de 10°C·min<sup>-1</sup>, sendo utilizada a primeira derivada para a determinação da temperatura máxima de degradação.

#### 4.6 - Metodologias utilizadas nos cálculos

- Fator de conversão de substrato em produto

$$Y_{\text{PHBV/S}} = \frac{\text{PHBV}_t - \text{PHBV}_0}{S_0 - S_t} \quad (2)$$

onde:

$Y_{\text{PHBV/S}}$  = fator de conversão de substrato em produto (g·g<sup>-1</sup>)

$\text{PHBV}_t$  = quantidade de polímero PHBV no tempo t (g·L<sup>-1</sup>)

$\text{PHBV}_0$  = quantidade de polímero PHBV no tempo 0 (g·L<sup>-1</sup>)

$S_0$  = quantidade de substrato no tempo 0 (g·L<sup>-1</sup>)

$S_t$  = quantidade de substrato no tempo t (g·L<sup>-1</sup>)

- Fator de conversão de substrato em biomassa

$$Y_{\text{X/S}} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S_t} \quad (3)$$

onde:

$Y_{\text{X/S}}$  = fator de conversão de substrato em biomassa (g·g<sup>-1</sup>)

$X_t$  = quantidade de biomassa no tempo t (g·L<sup>-1</sup>)

$X_0$  = quantidade de biomassa no tempo 0 (g·L<sup>-1</sup>)

$S_0$  = quantidade de substrato no tempo 0 (g·L<sup>-1</sup>)

$S_t$  = quantidade de substrato no tempo t (g·L<sup>-1</sup>)

- Produtividade em polímero PHBV (produto)

$$P_{\text{PHBV}} = \frac{\text{PHBV}_t - \text{PHBV}_0}{t - t_0} \quad (4)$$

onde:

- $P_{\text{PHBV}}$  = Produtividade de PHBV ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )
- $\text{PHBV}_t$  = quantidade de PHBV no tempo  $t$  ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
- $\text{PHBV}_0$  = quantidade de PHBV no tempo 0 ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
- $t$  = tempo de cultivo (h)
- $t_0$  = tempo inicial de cultivo (h)

- Grau de cristalinidade utilizando calorimetria exploratória diferencial

$$\chi_c = \frac{\Delta H_m - \Delta H_c}{\Delta H_m^0} \cdot 100 \quad (5)$$

onde:

- $\chi_c$  = Grau de cristalinidade
- $\Delta H_m$  = Entalpia de fusão da amostra ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )
- $\Delta H_c$  = Entalpia de cristalização da amostra ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )
- $\Delta H_m^0$  = Entalpia de fusão considerando polímero 100% cristalino ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )

## CAPÍTULO 5

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 5.1 - Produção de poli-hidroxicanoatos em *Chromobacterium violaceum*

Neste capítulo são apresentados os resultados dos cultivos realizados para a produção de biopolímeros em *C. violaceum* utilizando diferentes estratégias de cultivo. Foram realizados ensaios em agitador orbital e em biorreator de bancada analisando o nutriente limitante, o pH e as concentrações de glicose (substrato) e de propionato, que foi utilizado como co-substrato buscando aumentar a incorporação de unidades de valerato ao polímero. Os polímeros obtidos foram caracterizados quanto a sua composição e propriedades físico-químicas usando, microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TGA), cromatografia gasosa (CG) e inspeção visual da incorporação de violaceína.

#### 5.1.1 Produção de PHAs em *C. violaceum* em agitador orbital

Para analisar a influência da concentração de glicose e da adição de propionato sobre a biossíntese de poli-hidroxicanoatos em *C. violaceum*, a bactéria foi inicialmente cultivada em agitador orbital a 2,5 Hz e 30°C durante 48 horas. Nestas condições, sob limitação de nitrogênio ou de fósforo, foram realizados cultivos com pH inicial 6 ou 7, concentrações de glicose de 10, 20 ou 30 g·l<sup>-1</sup> e de propionato 0, 5, 10 ou 15 mM. As Tabelas 12 a 15 apresentam os resultados do pH final e da concentração de biomassa dos ensaios realizados em agitador orbital utilizando as condições de cultivo descritas. Os ensaios foram realizados em duplicata e a determinação da biomassa por gravimetria foi realizada em triplicata.

Tabela 12 - Valores do pH final e da biomassa obtidos no cultivo de *Chromobacterium violaceum* sob limitação de nitrogênio com pH inicial igual a 7, com e sem adição de propionato, a 30°C, 2,5 Hz e 48h.

Conc. Glicose (g·l <sup>-1</sup> )	Conc. Propionato (mM)	pH final	Biomassa (g·l <sup>-1</sup> )				
			01	02	03	Média	Desvio
10	0	4,90	2,4222	2,4222	2,4667	2,4370	0,0257
		4,92	2,2889	2,4000	2,4000	2,3630	0,0642
	5	5,71	0,9111	0,9333	0,9111	0,9185	0,0128
		5,72	0,9778	0,9556	0,9556	0,9630	0,0128
	10	5,90	0,6466	0,6444	0,6667	0,6519	0,0128
		5,87	0,6889	0,6667	0,6889	0,6815	0,0128
	15	6,03	0,4222	0,4222	0,4889	0,4444	0,0385
		5,97	0,4444	0,4889	0,4889	0,4741	0,0257
20	0	4,75	3,2222	3,3111	3,400	3,3111	0,0889
		4,72	3,3111	3,3778	3,400	3,3630	0,0463
	5	5,73	1,0222	1,1111	1,1778	1,1037	0,0780
		5,71	1,0889	1,2000	1,1333	1,1407	0,0559
	10	5,84	0,6889	0,7333	0,8000	0,7407	0,0559
		5,80	0,7111	0,8444	0,8444	0,8000	0,0770
	15	5,84	-	0,6222	0,6222	0,6222	0,0000
		5,87	0,5778	0,6222	0,6000	0,6000	0,0222
30	0	5,10	2,6667	2,7333	2,7556	2,7185	0,0463
		5,09	2,5778	2,5778	2,6444	2,6000	0,0385
	5	5,75	1,1111	1,1556	1,1556	1,1407	0,0257
		5,70	1,0889	1,0889	1,1556	1,1111	0,0257
	10	5,72	0,9111	0,8000	0,8222	0,8444	0,0588
		5,69	0,7333	0,7556	0,7556	0,7481	0,0128
	15	5,86	0,5333	0,5556	0,6000	0,5630	0,0339
		5,82	0,6000	0,6000	0,5778	0,5926	0,0128



Tabela 13 - Valores do pH final e da biomassa obtidos no cultivo de *Chromobacterium violaceum* sob limitação de nitrogênio com pH inicial igual a 6, com e sem adição de propionato, a 30°C, 2,5 Hz e 48h.

Conc. Glicose (g·l <sup>-1</sup> )	Conc. Propionato (mM)	pH final	Biomassa (g·l <sup>-1</sup> )				
			01	02	03	Média	Desvio
10	0	4,68	0,6444	0,6000	0,5778	0,6074	0,0339
		4,54	0,5778	0,5778	0,6444	0,6000	0,0385
	5	5,30	0,2000	0,2444	0,2222	0,2222	0,0222
		5,30	0,2444	0,2444	0,2889	0,2593	0,0257
	10	5,40	0,2444	0,2889	0,2444	0,2593	0,0257
		5,39	0,2000	0,2222	0,2222	0,2148	0,0128
	15	5,42	0,2667	0,2444	0,2667	0,2593	0,0128
		5,44	0,2889	0,2444	0,2667	0,2667	0,0222
20	0	4,42	0,5778	0,6222	0,5778	0,5926	0,0257
		4,45	0,5111	0,5333	0,4444	0,4963	0,0463
	5	5,23	0,2889	0,2889	0,2444	0,2741	0,0257
		5,23	0,3111	0,3111	0,3556	0,3259	0,0257
	10	5,34	0,2667	0,3111	0,3111	0,2963	0,0257
		5,36	0,3111	0,2889	0,3111	0,3037	0,0128
	15	5,39	0,2222	0,2667	0,3333	0,2741	0,0559
		5,45	0,3111	0,3333	0,2889	0,3111	0,0222
30	0	4,44	0,6000	0,6889	0,6667	0,6519	0,0463
		4,42	0,6889	0,6444	0,6444	0,6593	0,0257
	5	5,18	0,4222	0,4000	0,3333	0,3852	0,0463
		5,19	0,4000	0,3778	0,3778	0,3852	0,0128
	10	5,33	0,2444	0,3111	0,3333	0,2963	0,0463
		5,33	0,3111	0,3111	0,3778	0,3333	0,0385
	15	5,47	0,3333	0,3778	0,4000	0,3704	0,0339
		5,47	0,3556	0,3111	0,3111	0,3259	0,0257

Tabela 14 - Valores do pH final e da biomassa obtidos no cultivo de *Chromobacterium violaceum* sob limitação de fósforo com pH inicial igual a 7, com e sem adição de propionato, a 30°C, 2,5 Hz e 48h.

Conc. Glicose (g·l <sup>-1</sup> )	Conc. Propionato (mM)	pH final	Biomassa (g·l <sup>-1</sup> )				
			01	02	03	Média	Desvio
10	0	4,19	0,2667	0,3111	0,2667	0,2815	0,0257
		4,18	0,2667	0,2444	0,3333	0,2815	0,0463
	5	5,04	0,3111	0,2667	0,2667	0,2815	0,0257
		5,05	0,2222	0,2889	0,2444	0,2519	0,0339
	10	5,24	0,2000	0,2889	0,2444	0,2444	0,0444
		5,24	0,2889	0,3111	0,2444	0,2815	0,0339
	15	5,41	0,2444	0,2889	0,3111	0,2815	0,0339
		5,40	0,2222	0,2889	0,3111	0,2741	0,0463
20	0	4,19	0,3556	0,4444	0,4222	0,4074	0,0463
		4,24	0,3556	0,3778	0,4667	0,4000	0,0588
	5	5,02	0,3778	0,3556	0,4000	0,3778	0,0222
		4,99	0,2889	0,3111	0,3556	0,3185	0,0339
	10	5,21	0,3556	0,3333	0,3333	0,3407	0,0128
		5,19	0,2889	0,3556	0,3778	0,3407	0,0463
	15	5,33	0,3111	0,3111	0,2222	0,2815	0,0513
		5,34	0,2444	0,2889	0,2333	0,2593	0,0257
30	0	4,23	0,4222	0,4222	0,4444	0,4296	0,0128
		4,21	0,3111	0,4222	0,4444	0,3926	0,0714
	5	4,96	0,3556	0,3333	0,3333	0,3407	0,0128
		4,94	0,2667	0,3556	0,2889	0,3037	0,0463
	10	5,20	0,2444	0,3556	0,3556	0,3185	0,0642
		5,18	0,2889	0,2889	0,3111	0,2963	0,0128
	15	5,34	0,2222	0,2000	0,2444	0,2222	0,0222
		5,33	0,2000	0,2222	0,2444	0,2222	0,0222

Tabela 15 - Valores do pH final e da biomassa obtidos no cultivo de *Chromobacterium violaceum* sob limitação de fósforo com pH inicial igual a 6, com e sem adição de propionato, 30°C, 2,5 Hz e 48h.

Conc. Glicose (g·l <sup>-1</sup> )	Conc. Propionato (mM)	pH final	Biomassa (g·l <sup>-1</sup> )				
			01	02	03	Média	Desvio
10	0	4,19	0,2889	0,3111	0,2667	0,2889	0,0222
		4,17	0,2889	0,2667	0,2667	0,2741	0,0128
	5	4,87	0,2444	0,2000	0,3111	0,2519	0,0559
		4,88	0,2000	0,2000	0,2667	0,2222	0,0385
	10	5,08	0,2667	0,2222	0,2667	0,2519	0,0257
		5,09	0,2889	0,2667	0,2444	0,2667	0,0222
	15	5,24	0,2889	0,2889	0,2667	0,2815	0,0128
		5,25	0,2667	0,2222	0,2222	0,2370	0,0257
20	0	4,10	0,3111	0,3111	0,2889	0,3037	0,0128
		4,09	0,2667	0,2667	0,2889	0,2741	0,0128
	5	4,85	0,2444	0,2222	0,2000	0,2222	0,0222
		4,84	0,1556	0,2222	0,2000	0,1926	0,0339
	10	5,06	0,1778	0,2000	0,2222	0,2000	0,0222
		5,09	0,2222	0,2222	0,1778	0,2074	0,0257
	15	5,25	0,1556	0,2222	0,2222	0,2000	0,0385
		5,24	0,2444	0,1556	0,2222	0,2074	0,0463
30	0	4,03	0,2889	0,2889	0,4222	0,3333	0,0385
		4,06	0,3111	0,3778	0,3111	0,3333	0,0385
	5	4,81	0,2889	0,2444	0,2667	0,2667	0,0222
		4,81	0,2889	0,2444	0,2667	0,2667	0,0222
	10	5,06	0,2222	0,2444	0,2222	0,2296	0,0128
		5,08	0,2000	0,2667	0,2444	0,2370	0,0339
	15	5,22	0,2889	0,2667	0,2444	0,2667	0,0222
		5,20	0,2667	0,3111	0,2667	0,2815	0,0257

A análise dos resultados das Tabelas 12 a 15 indica que a produção de biomassa é fortemente influenciada pelo pH inicial e pelo nutriente limitante, sendo que maior produção de biomassa foi obtida nos ensaios que utilizaram limitação de nitrogênio com pH inicial 7. Com estas condições e concentração de  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicose, a produção de biomassa foi de  $3,36 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , enquanto a melhor produção de células sob limitação de nitrogênio e pH inicial 6 foi de apenas  $0,66 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  com uma concentração de glicose de  $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Sob limitação de fósforo, a produção de biomassa foi menor para os dois pHs iniciais testados, alcançando  $0,33 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  com pH inicial 6 e  $0,43 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  com pH inicial 7, ambos com uma concentração de glicose de  $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Em todas as condições testadas, a utilização de propionato diminuiu a produção de biomassa, demonstrando o efeito tóxico deste co-substrato sobre o crescimento celular. A inibição da formação da biomassa ficou mais evidente nos ensaios realizados sob limitação de nitrogênio e pH inicial 7, onde o aumento da concentração de propionato diminuiu a produção de biomassa por *C. violaceum* em todos os ensaios. Tomando como exemplo a biomassa produzida em pH inicial 7 e concentração de glicose de  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , o valor diminuiu de  $3,36 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  sem a adição de co-substrato para  $0,60 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  quando 15 mM de propionato foram utilizados. Esta redução não foi tão pronunciada nos ensaios realizados sob limitação de fósforo, onde o aumento da concentração de propionato apresentou um efeito inibitório reduzido sobre a produção de biomassa, sendo a maior diferença encontrada em pH inicial 7 e  $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicose, onde a adição de 15 mM de propionato ao meio diminuiu a produção de biomassa de  $0,43 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  para  $0,22 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Os valores do pH final em cada ensaio também evidenciam o efeito inibitório do propionato sob a produção de biomassa, ocorrendo um aumento do valor do pH final com o aumento da concentração de propionato. A adição de propionato alterou as características do meio de cultivo, resultando em condições desfavoráveis de crescimento da bactéria, diminuindo a quantidade de biomassa produzida.

A análise da composição qualitativa e quantitativa dos copolímeros produzidos por *C. violaceum* foi realizada escolhendo-se dezesseis condições utilizadas nos ensaios em frascos agitados. A biomassa obtida em cada experimento foi analisada por cromatografia gasosa. Para o cálculo dos fatores de conversão, a concentração de glicose no final do cultivo foi determinada pelo método DNS. As Tabelas 16 e 17 apresentam as condições de cultivo das amostras escolhidas dos ensaios realizados sob limitação de nitrogênio e fósforo.

Os valores para a concentração de glicose de 10 e 30 g·l<sup>-1</sup> foram escolhidos tomando por base estudos que mostram que *C. necator* utiliza glicose eficientemente como fonte de carbono em concentrações em torno de 20 g·l<sup>-1</sup>, sofrendo inibição em concentrações inferiores a 10 g·l<sup>-1</sup> (Kim et al., 1994; Oliveira, 1999). A escolha de 10 mM de propionato deve-se a estudos anteriores realizados com a *C. violaceum* ATCC 12472 que demonstraram que esta concentração de co-substrato foi a que proporcionou a melhor razão entre produção de biomassa e acúmulo de poli-hidroxicanoatos (Viegas, 2005).

A Tabela 16 apresenta os resultados para a concentração de biomassa e de PHAs nos ensaios realizados em *C. violaceum* sob limitação de nitrogênio a 30°C durante 48 horas. Os resultados obtidos para a determinação da biomassa realizados em triplicata, tanto para as condições testadas em pH inicial 7 e pH inicial 6, foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey, sendo que os valores indicados com mesma letra não são diferentes ao nível de 5% de significância.

Tabela 16 - Condições de cultivo, biomassa produzida (g·l<sup>-1</sup>), quantidade de PHAs (g·l<sup>-1</sup>), acúmulo de PHAs em 100 g de biomassa (g·g<sup>-1</sup>) e quantidade de butirato ou valerato em 100 g de PHBV (g·g<sup>-1</sup>) produzidos por *Chromobacterium violaceum* sob limitação de nitrogênio a 30°C durante 48 horas em agitador orbital. As concentrações de biomassa obtidas em pH inicial 7 e pH inicial 6 foram analisadas pelo teste de Tukey de forma independente ao nível de 5% de significância.

pH	Glicose (g·l <sup>-1</sup> )	Propionato (mM)	Biomassa (g·l <sup>-1</sup> )	PHAs <sup>1</sup> (g·l <sup>-1</sup> )	% Acúmulo <sup>2</sup> (g·g <sup>-1</sup> )	% 3HB <sup>3</sup> (g·g <sup>-1</sup> )	% 3HV <sup>3</sup> (g·g <sup>-1</sup> )
7	10	0	2,437 <sup>a</sup>	1,65	67,7	98,3	1,70
		10	0,652 <sup>b</sup>	0,46	71,0	91,7	8,30
	30	0	2,719 <sup>c</sup>	1,76	64,8	98,4	1,60
		10	0,844 <sup>d</sup>	0,33	39,3	84,6	15,4
6	10	0	0,607 <sup>e</sup>	0,34	56,1	93,6	6,40
		10	0,259 <sup>f</sup>	0,16	59,9	83,3	16,7
	30	0	0,652 <sup>e</sup>	0,27	40,9	91,3	8,70
		10	0,296 <sup>f</sup>	0,16	55,0	82,4	17,6

<sup>1</sup> PHAs - concentração de poli-hidroxicanoatos.

<sup>2</sup> g de PHA em 100g de biomassa.

<sup>3</sup> g de HB ou HV em 100g de PHBV.

Pelos dados da Tabela 16, observa-se que a produção de biomassa foi igual a 2,719 g e ocorreu em pH inicial 7, na concentração de glicose de 30 g·l<sup>-1</sup> na ausência de propionato. Nestas condições, o fator de conversão de glicose em biomassa ( $Y_{\text{biomassa/substrato}}$ ) foi igual a 0,12 g·g<sup>-1</sup>, considerando que apenas 23,2 g·l<sup>-1</sup> de glicose foram consumidas durante as 48 horas do experimento. Na concentração de 10 g·l<sup>-1</sup> de glicose, a biomassa sofreu uma pequena variação, sendo igual a 2,437 g·l<sup>-1</sup>, com  $Y_{\text{biomassa/substrato}}$  igual a 0,26 g·g<sup>-1</sup> (consumo de 9,22 g·l<sup>-1</sup> de glicose). Em pH inicial 6, sem a adição de propionato, a concentração de biomassa não são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ), produzindo 0,652 e 0,607 g·l<sup>-1</sup> quando a concentração de glicose diminuiu de 30 para 10 g·l<sup>-1</sup>, com  $Y_{\text{biomassa/substrato}}$  iguais a 0,03 e 0,10 g·g<sup>-1</sup> (consumo de glicose de 22,69 e 5,96 g·l<sup>-1</sup>). Em ensaios preliminares realizados com 50 e 100 g·l<sup>-1</sup> de glicose ocorreu uma forte inibição do crescimento de *C. violaceum*, sendo que em 100 g·l<sup>-1</sup> a inibição foi total. Os resultados demonstram que o aumento de 3 vezes na quantidade de glicose não produziu o mesmo rendimento na biomassa, não chegando nem mesmo a dobrar a quantidade obtida.

De modo geral, a adição de 10 mM de propionato ao meio de cultura produziu uma redução na biomassa produzida. Em pH inicial 7 e 30 g·l<sup>-1</sup> de glicose, a adição de propionato provocou uma queda de 69% na biomassa obtida em relação ao ensaio realizado na ausência de propionato, isto é, a biomassa decresceu de 2,719 g·l<sup>-1</sup> para 0,844 g·l<sup>-1</sup>, tendo sido esta redução a mais acentuada dentre os experimentos realizados.

Em relação ao percentual de polímero acumulado, os valores variaram entre 40,9 e 71,0 gramas de PHBV por 100 gramas de biomassa produzida. O maior percentual de PHA com relação à biomassa ocorreu em pH inicial 7, 10 g·l<sup>-1</sup> de glicose e 10 mM de propionato, tendo sido acumulado 0,46 g de polímero. Nestas condições, o fator de conversão de substrato em polímero ( $Y_{\text{PHA/substrato}}$ ) foi igual a 0,06 g·g<sup>-1</sup>. No entanto, na ausência de propionato,  $Y_{\text{PHA/substrato}}$  aumenta para 0,18 g·g<sup>-1</sup>, com um acúmulo de PHA de 1,65 g. Sendo assim, se não considerarmos o tipo de monômero incorporado ao PHA, esta condição é a mais favorável em termos de rendimento de polímero. Em pH 6 os percentuais de acúmulo foram influenciados pelo pH, diminuindo a quantidade de biomassa produzida, sendo que a quantidade de polímero acumulada foi menor nas condições em que o propionato foi utilizado como precursor de unidades de 3-hidroxisvalerato.

A maior quantidade de PHAs produzida ocorreu em pH 7,  $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicose e na ausência de propionato, tendo sido igual a  $1,76 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  ( $0,08 \text{ g}_{\text{PHBV}}\cdot(\text{g}_{\text{substrato}})^{-1}$ ). A concentração de PHBV obtida foi de  $1,65 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  para  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicose, com um fator de conversão de glicose em polímero de  $0,18 \text{ g}_{\text{PHBV}}\cdot(\text{g}_{\text{substrato}})^{-1}$ . O aumento da concentração de substrato não elevou significativamente a quantidade de polímero acumulado, sendo que a conversão de glicose em polímero diminuiu com o aumento da concentração de substrato. Em pH 6, apenas  $0,34 \text{ g}$  e  $0,27 \text{ g}$  de polímero foram obtidos sem utilização de propionato, com fatores de conversão de  $0,06$  e  $0,01 \text{ g}_{\text{PHBV}}\cdot(\text{g}_{\text{substrato}})^{-1}$ , respectivamente.

Tanto em pH inicial 7 como em 6, a utilização de  $10 \text{ mM}$  de propionato provocou queda na quantidade de PHBV acumulada. Em pH inicial 7, o acúmulo de polímero foi de  $0,46$  e de  $0,33 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  para as concentrações de  $10$  e  $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicose, com um fator de conversão de  $0,06$  e  $0,01 \text{ g}_{\text{PHBV}}\cdot(\text{g}_{\text{substrato}})^{-1}$ , respectivamente. Já em pH inicial 6, houve um rendimento de  $0,03$  e  $0,01 \text{ g}_{\text{PHBV}}\cdot(\text{g}_{\text{glicose}})^{-1}$  ( $0,16$  e  $0,16 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de PHBV) para  $10$  e  $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicose.

Em pH inicial 7, a incorporação de unidades de valerato foi de  $1,7\%$  e  $1,6\%$  para as concentrações de glicose testadas. Já em pH inicial 6, a utilização de  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  proporcionou uma incorporação de  $6,4\%$  de HV, enquanto que o aumento da concentração de glicose para  $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  favoreceu a incorporação de  $8,7\%$  de unidades de valerato. Estes resultados demonstram que a *C. violaceum* é capaz de incorporar monômeros de valerato utilizando apenas glicose como fonte de carbono.

A utilização de  $10 \text{ mM}$  de propionato aumentou a quantidade de 3HV incorporada ao polímero. A utilização de  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  em pH inicial 6 incorporou 2 vezes mais monômeros de valerato do que em pH inicial 7 utilizando a mesma concentração de glicose, com  $0,03 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de HV em  $0,16 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de copolímero. Considerando as variações dentro do mesmo pH inicial, o aumento da concentração de glicose aumenta a quantidade de unidades de valerato incorporadas, sendo esta relação menor em pH 6.

A Tabela 17 apresenta os resultados para a concentração de biomassa e de PHAs nos ensaios realizados com *C. violaceum* sob limitação de fósforo a  $30^\circ\text{C}$  durante 48 horas. Os resultados obtidos para a determinação da biomassa realizados em triplicata, tanto para as condições testadas em pH inicial 7 e pH inicial 6, foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey, sendo que os valores indicados com mesma letra não são diferentes ao nível de  $5\%$  de significância.

Tabela 17 - Condições de cultivo, biomassa produzida ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), quantidade de PHAs ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), acúmulo de PHAs em 100 g de biomassa ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e quantidade de butirato ou valerato em 100 g de PHBV ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) produzidos por *Chromobacterium violaceum* sob limitação de fósforo a 30°C durante 48 horas em agitador orbital. As concentrações de biomassa obtidas em pH inicial 7 e pH inicial 6 foram analisadas pelo teste de Tukey de forma independente ao nível de 5% de significância.

pH	Glicose ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Propionato (mM)	Biomassa ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	PHAs <sup>1</sup> ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	% Acúmulo <sup>2</sup> ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	% 3HB <sup>3</sup> ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	% 3HV <sup>3</sup> ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
7	10	0	0,281 <sup>a</sup>	0,14	50,2	100	0,00
		10	0,244 <sup>a</sup>	0,17	70,1	86,1	13,9
	30	0	0,430 <sup>b</sup>	0,21	49,0	90,1	9,90
		10	0,319 <sup>a</sup>	0,17	53,1	84,8	15,2
6	10	0	0,289 <sup>c</sup>	0,12	41,3	100	0,00
		10	0,252 <sup>c</sup>	0,14	54,8	82,1	17,9
	30	0	0,333 <sup>c</sup>	0,18	55,3	88,5	11,5
		10	0,230 <sup>c</sup>	0,12	50,1	76,2	23,8

<sup>1</sup> PHAs - concentração de poli-hidroxicanoatos.

<sup>2</sup> g de PHA em 100g de biomassa.

<sup>3</sup> g de HB ou HV em 100g de PHBV.

Os dados apresentados na Tabela 17 mostram uma queda da quantidade de biomassa produzida em relação aos resultados obtidos para a limitação em nitrogênio. A análise estatística A maior produção de biomassa sob limitação de fósforo ocorreu em pH inicial 7, na concentração de glicose de 30  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  e sem a adição de propionato, formando 0,430  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de biomassa, com um fator de conversão de glicose em biomassa de 0,02  $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , considerando que apenas 17,4  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicose foi consumida durante as 48 horas do experimento. Em pH inicial 6, os valores para a concentração de biomassa não são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) para as quatro condições testadas. O maior fator de conversão foi de 0,08  $\text{g}_{\text{biomassa}}\cdot(\text{g}_{\text{glicose}})^{-1}$  com 10  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicose inicial. Já a adição de 10 mM de propionato provocou uma diminuição na quantidade de biomassa produzida nas condições testadas em ambos os pHs. Esta queda da biomassa está relacionada à toxicidade do propionato e a inibição provocada pela concentração de glicose (Du et al., 2001).



A quantidade de polímero obtida sob limitação de fósforo foi um pouco maior em pH inicial 7 do que em pH inicial 6, com um máximo de  $0,21 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  com  $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicose e sem adição de propionato, com um fator de conversão de substrato em copolímero de  $0,01 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Com a adição de  $10 \text{ mM}$  de propionato, o acúmulo de polímero diminuiu em pH inicial 7, mas aumentou em pH inicial 6. Em pH inicial 6 e  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicose, apesar da quantidade de biomassa produzida ter sido menor, a adição de propionato aumentou a quantidade de polímero de  $0,12$  para  $0,14 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , com um fator de conversão de  $0,03 \text{ g}_{\text{PHBV}}\cdot(\text{g}_{\text{glicose}})^{-1}$  para ambos os ensaios.

Os fatores de conversão de substrato em polímero nos ensaios com limitação de fósforo sem adição de propionato foram menores que os obtidos sob limitação de nitrogênio. Em pH inicial 7, o fator máximo de conversão foi de  $0,05 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  e em pH 6 de  $0,04 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Os resultados obtidos demonstram que, tanto em pH inicial 7 como em pH inicial 6, com uma concentração de  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicose, não houve incorporação de unidades de valerato ao polímero, sendo o mesmo formado apenas por unidades de hidroxibutirato. Na concentração de  $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , o percentual de valerato foi de  $11,5\%$  em pH 6 e de  $9,9\%$  em pH inicial 7.

A utilização de  $10 \text{ mM}$  de propionato aumentou a quantidade de 3HV incorporado ao polímero. Em pH inicial 6, o percentual de HV no copolímero aumentou de  $17,9\%$  em  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  para  $23,8\%$  em  $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicose. Já em pH inicial 7, os valores foram mais próximos, sendo de  $13,9\%$  e  $15,2\%$  quando  $10$  e  $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicose foram utilizadas.

Da análise dos resultados, tanto sob limitação de nitrogênio como sob limitação de fósforo, destacam-se os seguintes aspectos:

- A adição de propionato diminuiu a quantidade de biomassa produzida em todas as condições testadas. Isto está relacionado à toxicidade do propionato sobre as células, inibindo o seu crescimento celular. Du e colaboradores (2001) demonstraram que em culturas em frascos agitados com *C. necator*, o aumento da concentração de propionato de  $3,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  para  $12,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  diminuiu a produção de biomassa de  $4,6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  para  $3,9 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .
- O máximo acúmulo de polímero obtido foi de aproximadamente  $70 \text{ g}$  de polímero em  $100 \text{ g}$  de biomassa em pH inicial 7,  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicose e  $10 \text{ mM}$  de propionato, tanto para os ensaios com limitação em nitrogênio, quanto limitação em fósforo. Este valor está próximo

aos obtidos para outros microrganismos que acumulam PHBV utilizando propionato como co-substrato, como por exemplo, 78,3% para *C. necator* (Du et al., 2001) e 78,2% para *E. coli* recombinante (Choi e Lee, 1999b).

- Unidades de valerato foram incorporadas ao biopolímero quando glicose foi utilizada como única fonte de carbono, acumulando até 11,5% de unidades de valerato no copolímero sob limitação de fósforo, pH inicial 6 e 30 g·l<sup>-1</sup> de glicose. Também em *C. violaceum* e utilizando apenas glicose como fonte de carbono, Kolibachuk e colaboradores (1999) obtiveram 2% de incorporação de valerato, enquanto Viegas (2005) obteve 7% de HV no copolímero.
- O percentual de unidades de valerato obtido a partir da utilização de 10 mM de propionato aumentou em relação aos ensaios realizados sem a utilização de propionato. A fração de 3HV presente no copolímero de 23,8 g de valerato por 100 g de polímero foi obtida nas condições de cultivo sob limitação de fósforo, a pH inicial 6, com 30 g·l<sup>-1</sup> de glicose e 10 mM de propionato. A incorporação de unidades de valerato está relacionada à formação de propionil-CoA que, ao ser condensado com um acetil-CoA, forma unidades de 5 carbonos, que são incorporadas ao polímero devido à baixa especificidade da PHA sintase do tipo I de *C. violaceum* (Doi et al., 1990; Steinbüchel et al., 1993; Liebergesell et al., 2000; Du et al., 2001). A fração de 3HV obtida está próxima a outros valores encontrados na literatura, sendo de 16,2% (Du et al., 2001), 25,4% (Marangoni et al., 2000) e 29,8% (Kim et al., 1994) para *C. necator* e 15,21% para *E. coli* recombinante (Choi e Lee, 1999b).
- O pH medido no final dos ensaios em ambas as condições de limitação ficou abaixo do pH inicial dos experimentos. Esta diminuição do pH resultou em condições de crescimento desfavoráveis para a *C. violaceum*, reduzindo a formação de biomassa. O decréscimo do pH pode estar relacionado à formação de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a partir do momento do consumo de íons amônio pelas bactérias (Khanna e Srivastava, 2005). Para as culturas realizadas com 10 mM de propionato, os valores de pH ao final do ensaio foram maiores que os encontrados nos experimentos sem a adição de propionato. Provavelmente isto ocorra devido à inibição provocada pelo propionato (tóxico para as células) (Du et al., 2001), diminuindo a velocidade de crescimento das bactérias, mas aumentando o acúmulo de unidades de valerato no copolímero. Em

pH inicial 6, o crescimento da biomassa ficou ainda mais inibido devido às condições desfavoráveis do meio, ocorrendo a formação de uma quantidade de biomassa menor do que em pH inicial 7.

- Sob limitação de fósforo, o efeito tamponante propiciado pelo fosfato vai sendo reduzido com o tempo, diminuindo o pH do meio. Esta situação favorece a incorporação de unidades de valerato, chegando a 23,8% com 30 g·l<sup>-1</sup> de glicose e 10 mM de propionato. Provavelmente a diminuição do pH favoreça a via de conversão de propionato a propionil-CoA, sendo o propionil-CoA precursor para a formação de unidades de valerato (Doi et al., 1990).
- Dos resultados obtidos, podemos verificar que o copolímero P(3HB-co-3HV) pode ser produzido por *C. violaceum* utilizando como única fonte de carbono glicose, sem a necessidade da utilização de precursores de 3HV, como o propionato. A utilização de propionato como co-substrato aumentou a fração molar de 3HV no copolímero.

### 5.1.2 Produção de PHAs em *C. violaceum* em biorreator

Foram realizados quatro experimentos, varindo-se o nutriente limitante (nitrogênio ou fósforo) e a concentração de propionato (0 e 10 mM), conforme descritos na Tabela 9 (Materiais e Métodos). Escolheu-se trabalhar com uma concentração de glicose de 20 g·l<sup>-1</sup> por ter sido o resultado que produziu a maior quantidade de biomassa nos ensaios em agitador orbital.

Os dois primeiros ensaios foram realizados com limitação de nitrogênio. O biorreator foi preparado com meio mineral (Tabela 7) e inoculado com 400 ml de *C. violaceum*, 20 g·l<sup>-1</sup> de glicose, com controle do pH em 7. A temperatura utilizada foi de 30°C, agitação entre 400 e 800 min<sup>-1</sup> e aeração entre 0,5 e 2,0 vvm, de modo a se obter a pressão parcial de oxigênio dissolvido sempre superior a 30% da saturação.

As Figuras 12 e 13 apresentam os resultados obtidos para os ensaios em biorreator sob limitação de nitrogênio, pH 7, concentração de glicose de 20 g·l<sup>-1</sup>, sendo que no segundo experimento foram adicionados 10 mM de propionato. As curvas contínuas representam a linha de tendência calculada pelo software *Excel*.

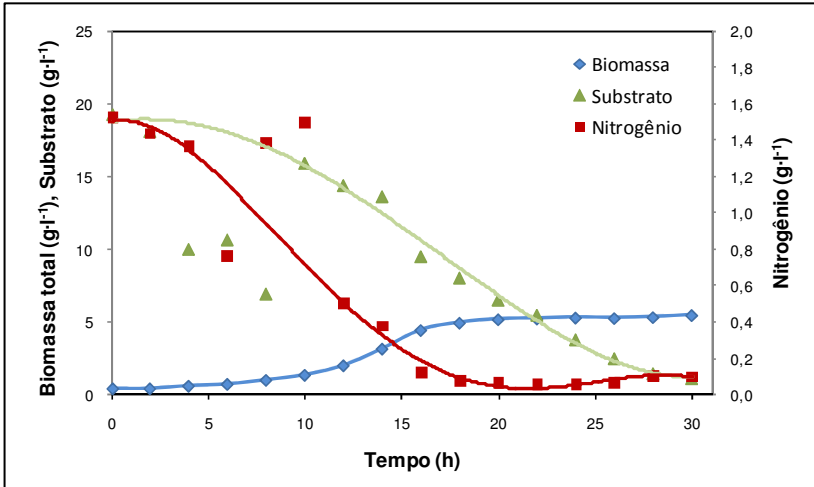


Figura 12 - Cinética da produção de biomassa (◆), consumo de substrato (▲) e de nitrogênio (■) para o cultivo de *Chromobacterium violaceum* a 30°C, pH 7 e 20 g·l<sup>-1</sup> de glicose sob limitação de nitrogênio, sem adição de propionato.

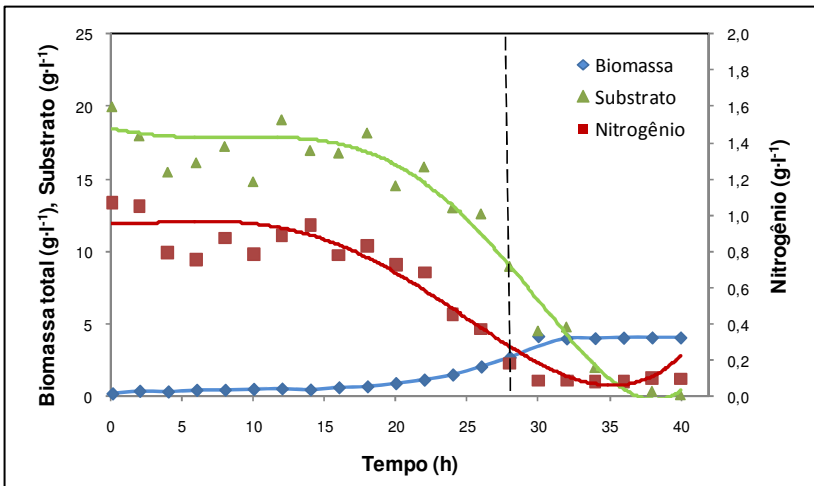


Figura 13 - Cinética da produção de biomassa (◆), consumo de substrato (▲) e de nitrogênio (■) para o cultivo de *Chromobacterium violaceum* a 30°C, pH 7 e 20 g·l<sup>-1</sup> de glicose sob limitação de nitrogênio, com a adição de 10 mM de propionato. A linha tracejada representa o momento no qual foram adicionados 10 mM de propionato.

Os ensaios de fermentação para a produção de poli-hidroxialcanoatos podem ser divididos em duas fases. A primeira fase, conhecida como fase exponencial de crescimento, está relacionada ao crescimento celular do microrganismo, sendo o substrato direcionado para a formação de biomassa. A segunda fase inicia-se no momento da limitação de um dos nutrientes essenciais, ocorrendo o direcionamento do substrato presente no meio para o acúmulo de poli-hidroxialcanoatos.

Em meios limitados em nitrogênio, concentrações abaixo de  $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  deste nutriente permitem o acúmulo de PHAs ainda durante a fase de crescimento do microrganismo, continuando esta incorporação durante a fase em que existe uma quantidade mínima de nitrogênio (Ramsay et al., 1990). Analisando os dados apresentados nas Figuras 12 e 13, a concentração de  $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de nitrogênio foi atingida com 16 e 28 horas de cultivo, respectivamente, permitindo que a fase de acúmulo de polímero fosse de 14 horas para o primeiro experimento e de 12 horas para o experimento com a adição de 10 mM de propionato.

Após a limitação do nitrogênio em ambos os experimentos, a glicose presente no meio de cultivo foi direcionada à formação de poli-hidroxialcanoatos. Apesar de não ocorrer mais a formação de células, a concentração de biomassa aumentou devido à formação de grânulos de PHAs intracelularmente, conforme pode ser observado nas curvas de produção de biomassa e consumo de glicose nas Figuras 12 e 13.

A Tabela 18 apresenta os resultados obtidos para os cultivos de *C. violaceum* sob limitação de nitrogênio utilizando o biorreator, pH 7, concentração de glicose de  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , sendo o ensaio 2 com adição de 10 mM de propionato.

Tabela 18 - Biomassa produzida ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), quantidade de PHAs obtidos ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) e quantidade de butirato ou valerato em 100 g de PHBV ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) produzidos em biorreator por *Chromobacterium violaceum* sob limitação de nitrogênio,  $30^\circ\text{C}$ , pH 7, concentração de glicose de  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Exp.	Propionato (mM)	Biomassa ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	PHAs <sup>a</sup> ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	% Acúmulo <sup>b</sup> ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	3HB <sup>c</sup> ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	3HV <sup>c</sup> ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
1	0	$5,467 \pm 0,104$	1,96	35,8	96,6	3,4
2	10	$4,117 \pm 0,076$	1,78	43,4	96,6	3,4

<sup>a</sup> PHAs - concentração de poli-hidroxialcanoatos.

<sup>b</sup> g de PHA em 100g de biomassa.

<sup>c</sup> g de HB ou HV em 100g de PHBV.

Pela Tabela 18, a quantidade de biomassa obtida quando da utilização de  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicose sem a adição de propionato ( $5,467 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) foi superior a biomassa obtida com  $10 \text{ mM}$  de propionato ( $4,117 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Novamente percebe-se o efeito tóxico do propionato sobre as células.

Em termos de biopolímero acumulado, a maior quantidade obtida foi de  $1,96 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  com  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de substrato, com uma fração de 35,8% de PHBV na biomassa, resultando em um rendimento de glicose em biopolímero de  $0,10 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  e uma produtividade de  $0,07 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . A utilização de  $10 \text{ mM}$  de propionato diminuiu a quantidade de polímero produzido para  $1,78 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , mas aumentou a fração de PHAs acumulados para 43,4%, com um rendimento de glicose em polímero de  $0,09 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  e produtividade de  $0,05 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . No caso do experimento com adição de co-substrato, o propionato diminuiu a produção de biomassa, mas melhorou a incorporação de biopolímeros. Os valores encontrados para a produtividade estão abaixo dos valores encontrados na literatura para a *C. necator* em condições semelhantes de cultivo. Lee (1996a) reportou para a *C. necator* uma produtividade de  $2,42 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  quando ela é cultivada com  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicose e  $2,55 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  quando cultivada com uma mistura de glicose e ácido propiônico 50:50.

A adição de propionato não aumentou a fração de unidades de ácido 3-hidroxicloroaléico no copolímero. A fração de HV para os dois ensaios com concentração de substrato de  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  foram iguais: 3,4 g de valerato por 100 g de polímero.

Os ensaios 3 a 4 foram realizados com limitação de fósforo. O biorreator foi preparado com meio mineral (Tabela 7) e inoculado com 400 ml de *C. violaceum*,  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicose, com controle de pH em 7. A temperatura utilizada foi de  $30^\circ\text{C}$ , agitação entre 400 e  $800 \text{ min}^{-1}$  e aeração entre 0,5 e  $2,0 \text{ vvm}$ , de modo a se obter a pressão parcial de oxigênio dissolvido sempre superior a 30% da saturação.

As Figuras 14 e 15 apresentam os resultados obtidos para os ensaios em biorreator sob limitação de fósforo, pH 7, concentração de glicose de  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , sendo que no segundo experimento foram adicionados  $10 \text{ mM}$  de propionato. As curvas contínuas representam a linha de tendência calculada pelo software *Excel*.

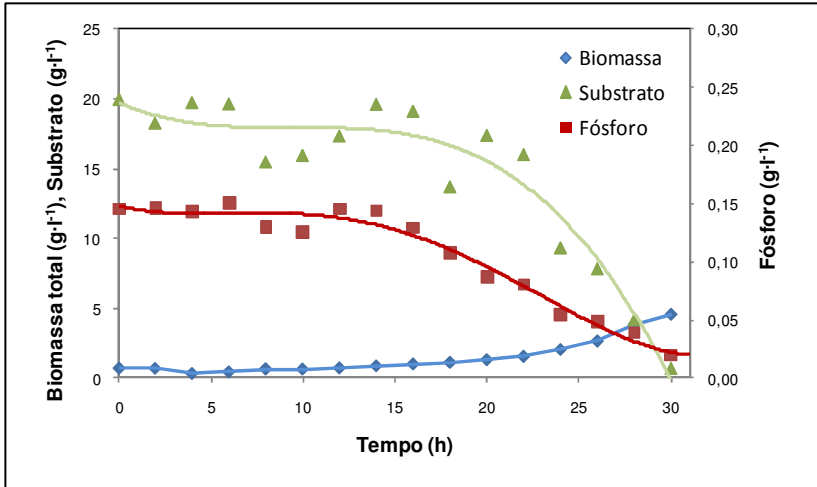


Figura 14 - Cinética da produção de biomassa (◆), consumo de substrato (▲) e de fósforo (■) para o cultivo de *Chromobacterium violaceum* a 30°C, pH 7 e 20 g·l<sup>-1</sup> de glicose sob limitação de fósforo, sem adição de propionato.

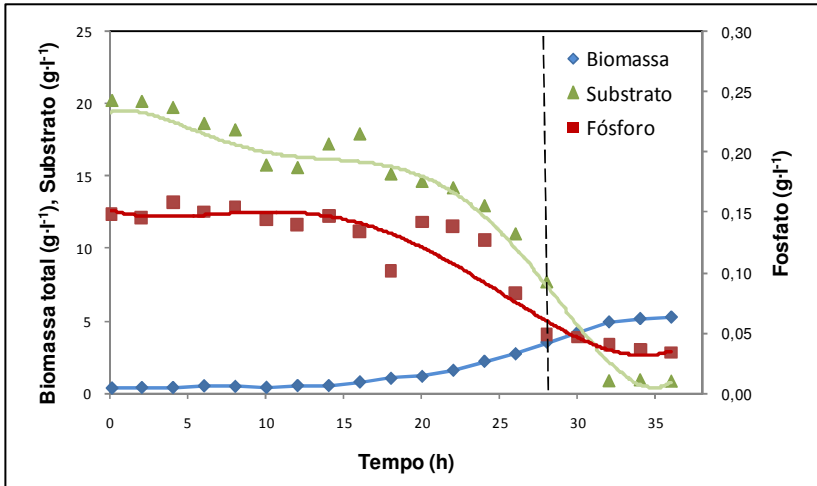


Figura 15 - Cinética da produção de biomassa (◆), consumo de substrato (▲) e de fósforo (■) para o cultivo de *Chromobacterium violaceum* a 30°C, pH 7 e 20 g·l<sup>-1</sup> de glicose sob limitação de fósforo, com a adição de 10 mM de propionato. A linha tracejada representa o momento no qual foram adicionados 10 mM de propionato.

Nos ensaios onde o nutriente limitante foi o fósforo, concentrações inferiores a  $0,05 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  permitiram o acúmulo de PHAs ainda durante a fase de crescimento não limitado, pois, como este elemento não faz parte da composição de proteínas, isto permite que ocorra um crescimento residual de biomassa com um aumento no acúmulo de polímero (Aragão et al., 1996). A concentração de  $0,05 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  para o fósforo foi atingida com 24 e 28 horas de cultivo. Desta maneira, a fase de acúmulo de polímeros foi de apenas 6 horas para o primeiro experimento e de 8 horas para o experimento com a adição de 10 mM de propionato. Este fato ajuda a explicar um menor acúmulo de polímero em relação à biomassa produzida nos experimentos com limitação em fósforo.

A Tabela 19 apresenta os resultados obtidos para os cultivos de *C. violaceum* sob limitação de fósforo utilizando o biorreator, pH 7, concentração inicial de glicose de  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , sendo o ensaio 4 com adição de 10 mM de propionato.

Tabela 19 - Biomassa produzida ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), quantidade de PHAs obtidos ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) e quantidade de butirato ou valerato em 100 g de PHBV ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) produzidos em biorreator por *Chromobacterium violaceum* sob limitação de fósforo a  $30^\circ\text{C}$ , pH 7 e concentração de glicose de  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Exp.	Propionato (mM)	Biomassa ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	PHAs <sup>a</sup> ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	% Acúmulo <sup>b</sup> ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	3HB <sup>c</sup> ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	3HV <sup>c</sup> ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
3	0	$6,542 \pm 0,036$	1,43	21,8	95,4	4,6
4	10	$5,233 \pm 0,029$	1,82	34,9	96,9	3,1

<sup>a</sup> PHAs - concentração de poli-hidroxicanoatos.

<sup>b</sup> g de PHA em 100g de biomassa.

<sup>c</sup> g de HB ou HV em 100g de PHBV.

Analisando a Tabela 19, a quantidade de biomassa obtida para  $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicose sem adição de propionato foi de  $6,542 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Este valor é mais de 15 vezes superior ao valor encontrado nos ensaios em agitador orbital em pH inicial 7, tanto para  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de glicose ( $0,289 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de biomassa), quanto para uma concentração de substrato de  $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  ( $0,430 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de biomassa). Este fato pode estar relacionado ao melhor controle das condições operacionais no biorreator, principalmente do pH, que é



controlado em 7 pela adição de base ou de ácido, dependendo do pH do meio. Na concentração de 20 g·l<sup>-1</sup> de glicose, a adição de 10 mM de propionato produziu 5,23 g·l<sup>-1</sup>, ocorrendo uma diminuição da biomassa em aproximadamente 20%.

Os valores de biomassa obtidos no biorreator sob limitação de fósforo foram maiores do que a quantidade de biomassa produzida sob limitação de nitrogênio. Como o fósforo não participa diretamente na síntese de proteína, a limitação neste elemento não bloqueou a síntese de proteínas, o que pode ter permitido a manutenção da atividade metabólica celular, com produção de PHBV (Oliveira, 1999).

A quantidade de polímero acumulado em 20 g·l<sup>-1</sup> foi de 21,8% da biomassa total, representando 1,43 g·l<sup>-1</sup> de polímero, com um rendimento de 0,07 g·g<sup>-1</sup> e uma produtividade de 0,05 g·l<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>. Já com a utilização de 10 mM de propionato, a quantidade de polímero obtida foi de 1,82 g·l<sup>-1</sup>, acumulando 34,9% de PHAs em relação a quantidade total de biomassa produzida, com um rendimento de glicose em polímero de 0,09 g·g<sup>-1</sup> e uma produtividade de 0,05 g·l<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>.

A fração de HV incorporada sob limitação de fósforo foi de 4,6% para uma concentração de 20 g·l<sup>-1</sup> de glicose sem adição de propionato, e de 3,1% na utilização de 10 mM de propionato com a mesma concentração de substrato. A adição de propionato diminuiu em 32% a quantidade de unidades de valerato incorporadas.

A análise dos resultados demonstra que, tanto nos cultivos sob limitação de nitrogênio, como sob limitação de fósforo, a quantidade de biomassa e de PHAs formados foram superiores aos obtidos nos ensaios em agitador orbital. Este fato pode estar relacionado ao melhor controle das condições de cultivo proporcionadas pelo biorreator, como por exemplo, aeração do meio (sempre acima de 30% do valor máximo de saturação) e controle de pH (Khanna e Srivastava, 2005).

A análise da fração de HV incorporada ao copolímero demonstrou que *C. violaceum* é capaz de acumular unidades de valerato utilizando glicose como única fonte de carbono. Os valores obtidos para o acúmulo de unidades de valerato foram de 3,4 e 4,6% para limitação de nitrogênio e de fósforo, respectivamente. Kolibachuk e colaboradores (1999), utilizando apenas glicose como fonte de carbono, obtiveram 38% de acúmulo de PHAs, com uma fração de 2% de unidades de valerato. Steinbüchel e colaboradores (1993) obtiveram 100% de valerato em *C. violaceum* DSM 30191 utilizando apenas ácido valérico como fonte de carbono.

A utilização de propionato como co-substrato durante o cultivo de *C. violaceum* em biorreator diminuiu a fração de unidades de HV sob limitação de fósforo (4,6 para 3,1%), permanecendo constante sob limitação de nitrogênio (3,4 e 3,4%). Em ambos os casos, o controle do pH no biorreator pode estar associado ao menor acúmulo de unidades de HV ao polímero. Para a *C. violaceum*, a adição de propionato não aumenta a quantidade de unidades de valerato incorporado, pois parece haver uma tendência a ocorrer uma maior incorporação de HV em pHs mais baixos, como ocorreu nos ensaios em agitador orbital.

Khanna e Srivastava (2005) sugerem que o consumo dos íons amônio do sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) libera ânions que formam ácido sulfúrico, baixando o pH do meio e diminuindo o crescimento da bactéria. Com o controle do pH pelo biorreator, os cátions H<sup>+</sup> são neutralizados pela base NaOH adicionada ao meio, permitindo um maior crescimento da biomassa no biorreator e assim, uma maior incorporação de polímero. Sob limitação de fósforo, apesar do consumo de fosfato diminuir o tamponamento do meio, a adição de base permite manter o pH em 7, diminuindo a formação de polímero quando comparado aos valores obtidos em agitador orbital.

Os valores obtidos para a fração de HV obtida com a adição de 10 mM de propionato (3,4 e 3,1%) foram inferiores aos obtidos por Kim e colaboradores (1994) para a *C. necator*, que obtiveram valores entre 4,3 e 14,3%, dependendo da quantidade de propionato utilizado.

## 5.2 - Caracterização dos biopolímeros

A *C. violaceum* possui uma característica fenotípica marcante, a produção da violaceína, que a distingue da maioria das bactérias (Antônio e Creczynski-Pasa, 2004). Este pigmento é formado por duas moléculas de triptofano, aminoácido que possui sua biossíntese relacionada ao consumo de fosfoenolpiruvato (PEP) e eritrose-4-fosfato (E4P), formados a partir de glicose pela via glicolítica (Berg et al., 2007). Portanto, a formação de moléculas de violaceína desvia uma parte da glicose, reduzindo a quantidade de substrato para a formação de PHAs. A Figura 16 apresenta uma sequência de imagens que mostra a formação de violaceína durante os cultivos realizados com a *C. violaceum*. Tanto em limitação de nitrogênio como em limitação de fósforo ocorreu a formação da violaceína.



Figura 16 - Produção de poli-hidroxicanoatos em *Chromobacterium violaceum* utilizando biorreator de bancada. A coloração violácea do meio de cultivo é devido à formação da violaceína.

A Figura 17 mostra o resultado do processo de extração da biomassa produzida por *C. violaceum* no biorreator. A violaceína, produzida durante o experimento no biorreator, foi obtida misturada aos biopolímeros devido à extração com clorofórmio, que rompe a parede da célula e libera tanto a violaceína como os grânulos de PHAs.

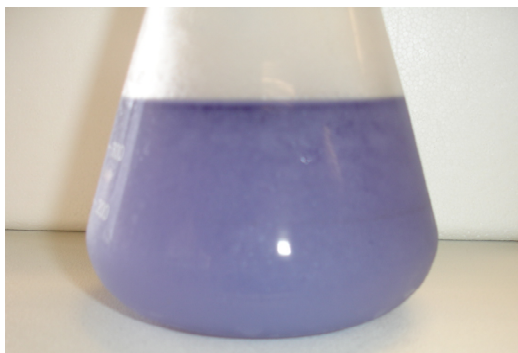


Figura 17 - Extração dos poli-hidroxicanoatos produzidos por *Chromobacterium violaceum* da biomassa produzida em biorreator. A coloração violácea é devida à violaceína presente na solução.

A solução contendo PHA e violaceína da Figura 17 foi filtrada, permanecendo durante 3 a 4 dias em temperatura ambiente para a evaporação dos restos do solvente utilizado. A Figura 18 mostra o polímero já seco, pronto para ser utilizado ou analisado. A coloração violácea do polímero resultante é devido à presença da violaceína.



Figura 18 - Material seco obtido da extração da biomassa produzida em biorreator por *Chromobacterium violaceum*. A coloração violácea é devida à presença de violaceína.

### 5.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do polímero obtido, o material extraído das biomassas de *C. violaceum* e de *C. necator* produzidas em biorreator foi transformado em filme. O polímero foi dissolvido em clorofórmio na razão de 2% (m/v) e após completa solubilização, a evaporação do solvente promoveu a formação do filme polimérico (item 4.4.2).

As Figuras 19 e 20 apresentam as micrografias das superfícies dos filmes obtidos dos polímeros produzidos por *C. violaceum* e *C. necator* sob limitação de nitrogênio, pH 7, 30°C e 20 g·l<sup>-1</sup> de glicose.

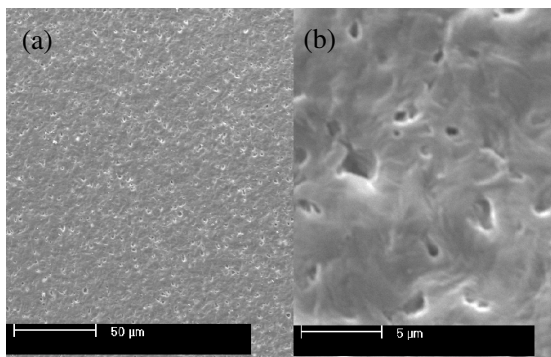


Figura 19 - Micrografias de MEV da superfície do filme de PHAs de *Chromobacterium violaceum* obtido em biorreator sob limitação de nitrogênio, pH 7, 30°C e 20 g·l<sup>-1</sup> de glicose. (a) 400X. (b) 4000X.

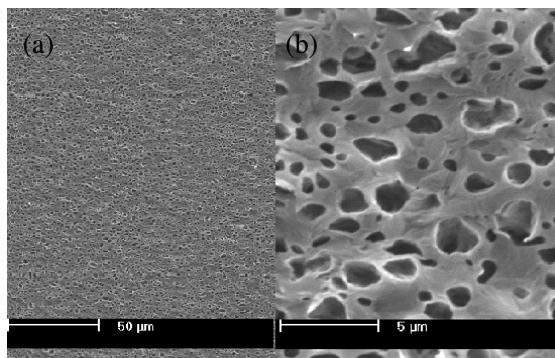


Figura 20 - Micrografias de MEV da superfície do filme de PHAs de *Cupriavidus necator* obtido em biorreator sob limitação de nitrogênio, pH 7, 30°C e 20 g·l<sup>-1</sup> de glicose. (a) 400X. (b) 4000X.

A Figura 19 mostra que a superfície do filme produzido com o copolímero PHBV obtido de *C. violaceum* é composta por uma matriz pouco porosa, apresentando poros com diâmetros médios de 0,6 μm, distribuídos na superfície da membrana. O filme formado a partir do PHB sintetizado por *C. necator* (Figura 20) revela uma matriz mais porosa quando comparada ao filme de *C. violaceum*, sendo que os poros possuem um diâmetro médio de 1,5 μm. Em ambos os casos, as bordas dos poros são uniformes e não apresentam falhas. A microestrutura dos poros dos filmes poliméricos permite sua aplicação como material de revestimento de *stents* vasculares, pois impedem o extravasamento de células do sangue para tecidos periféricos, mas permitindo a troca de oxigênio através de seus poros.

### 5.2.2 Espectrometria na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR é uma excelente técnica de caracterização de compostos orgânicos, pois cada ligação característica de um grupo funcional apresenta uma banda de vibração em uma frequência específica. Um espectro de infravermelho representa a composição total de um composto, pois cada componente químico na amostra contribui de forma individual para o espectro de absorvância, permitindo analisar as interações e mudanças na morfologia dos componentes, pois combina

as interações químicas e a estrutura conformacional da molécula (Kansiz et al., 2000; Spier, 2005).

A Figura 21 apresenta o espectro de infravermelho obtido por Schneider (2006) para o polímero poli-hidroxiбутирато (PHB) produzido por *C. necator*.

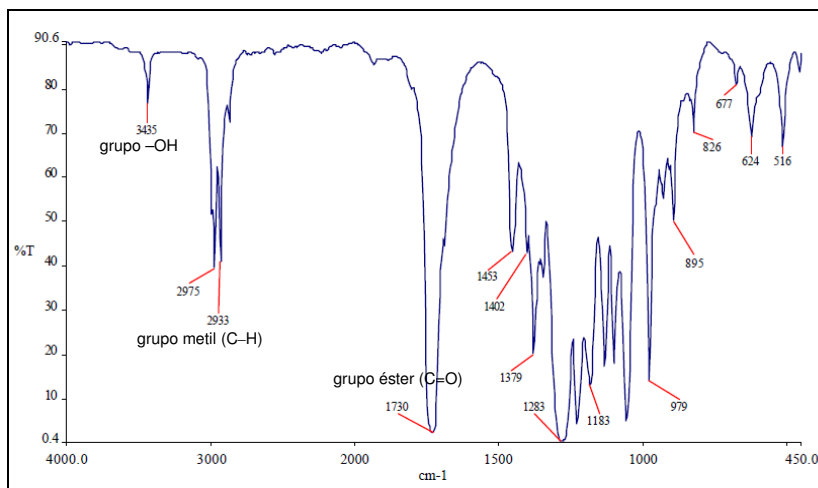


Figura 21 - Espectro de FTIR para o poli-hidroxiбутирато (PHB) obtido a partir de *Cupriavidus necator* (Schneider, 2006).

As Figuras 22 a 25 apresentam os espectros de infravermelho dos polímeros sintetizados por *C. violaceum* em biorreator a 30°C, pH 7 e 20 g·l<sup>-1</sup> de glicose.

A análise dos espectros das Figuras 22 a 25 obtidos para os PHAs produzidos por *C. violaceum* permite observar que em todos os polímeros obtidos nas condições de cultivo utilizadas nos experimentos encontram-se as bandas características dos poli-hidroxiácidoalcanoatos, sendo que os resultados estão de acordo com os obtidos por Schneider (2006) para o PHB produzido por *C. necator*. A Tabela 20 apresenta as bandas identificadas no espectro de FTIR, bem como as atribuições relacionadas a cada uma.

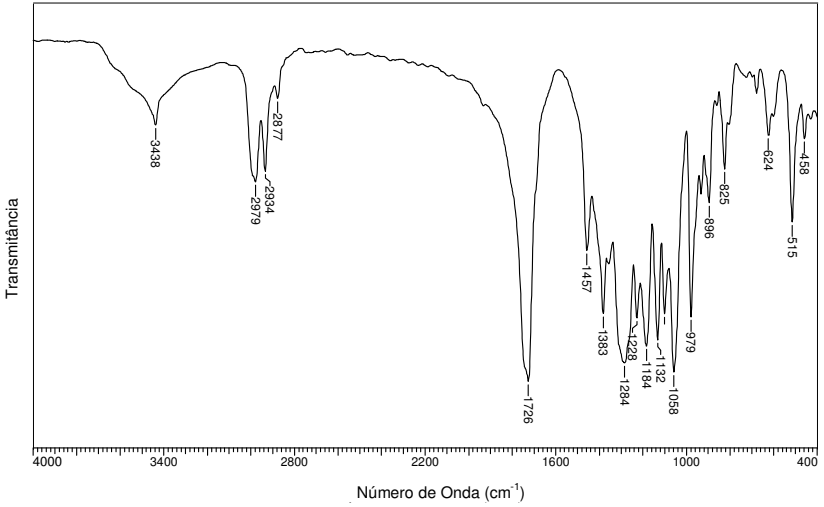


Figura 22 - Espectro de FTIR para o polímero sintetizado por *C. violaceum* em biorreator sob limitação de nitrogênio a 30°C, pH 7, 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose, sem adição de propionato.

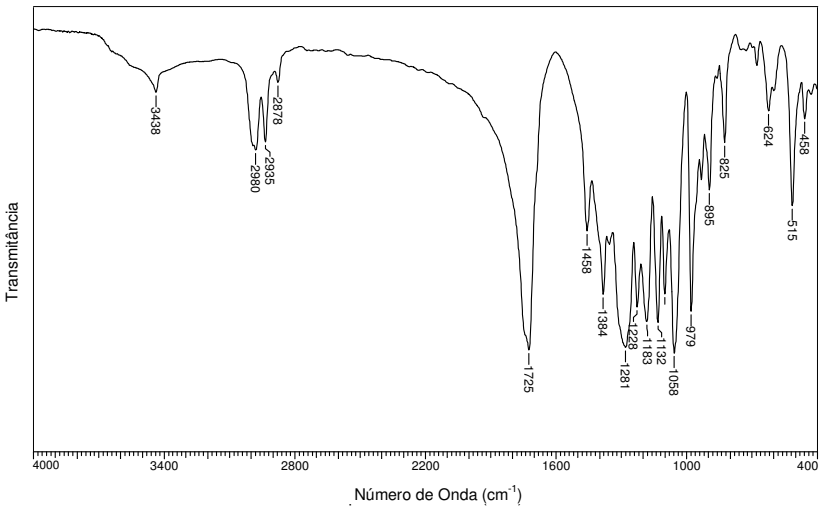


Figura 23 - Espectro de FTIR para o polímero sintetizado por *C. violaceum* em biorreator sob limitação de nitrogênio a 30°C, pH 7, 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose, com adição de 10 mM de propionato.

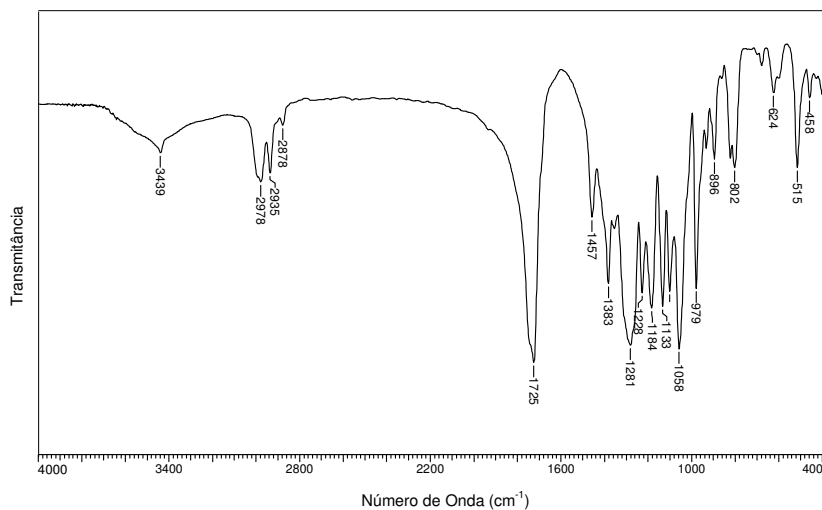


Figura 24 - Espectro de FTIR para o polímero sintetizado por *C. violaceum* em biorreator sob limitação de fósforo a 30°C, pH 7, 20 g·l<sup>-1</sup> de glicose, sem adição de propionato.

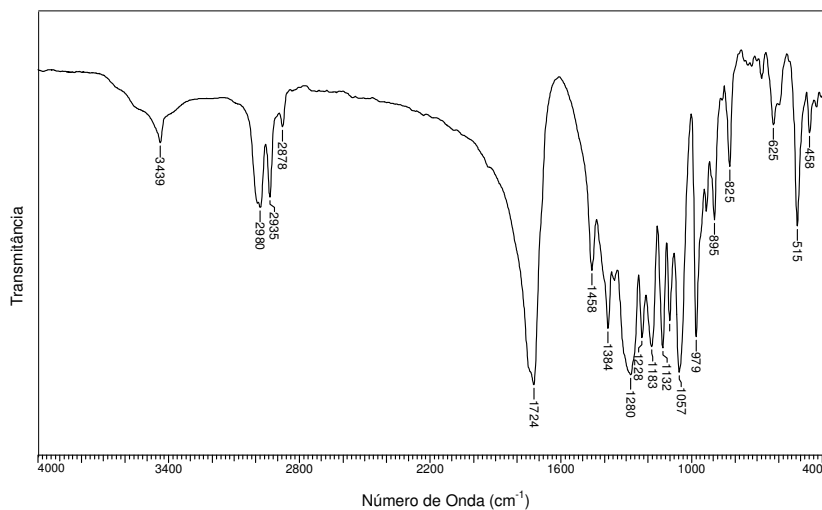


Figura 25 - Espectro de FTIR para o polímero sintetizado por *C. violaceum* em biorreator sob limitação de fósforo a 30°C, pH 7, 20 g·l<sup>-1</sup> de glicose, com adição de 10 mM de propionato.



Tabela 20 - Localização e atribuições das principais bandas de infravermelho dos polímeros PHB (produzido por *Cupriavidus necator*) e PHBV (produzidos por *Chromobacterium violaceum*).

Número de Onda (cm <sup>-1</sup> )		Atribuição
PHB	PHBV	
516, 979	515, 979	deformações angulares e axiais da ligação C–C
1134	1132, 1133	estiramentos simétricos e assimétricos do grupo C–O–C
1187	1183, 1184	estiramentos simétricos e assimétricos do grupo C–O–C
1379	1383, 1384	deformação assimétrica da ligação C–H do grupo metil
1453	1457, 1458	deformação assimétrica da ligação C–H do grupo metil
1730	1724, 1725	deformação axial do grupo éster (C=O)
2933	2934, 2935	deformação angular da ligação C–H do grupo metil
2975	2978-2980	deformação angular da ligação C–H do grupo metil
3435	3438, 3439	Grupo –OH

Fonte: Kansiz et al., 2000; Thakor et al., 2005.

Analisando os dados da Tabela 20, nota-se que ocorre uma pequena diferença entre os valores de localização das bandas dos polímeros PHB e PHBV. Apesar do aumento da cadeia carbônica lateral no PBHV, com o acréscimo de um grupo metil, a localização exata das bandas depende do grau de cristalinidade do biopolímero. Em todos os polímeros analisados, a banda com maior intensidade ocorreu entre 1725 e 1730 cm<sup>-1</sup>. Esta banda está relacionada à intensa deformação axial do grupo éster (C=O) (Kansiz et al., 2000).

### 5.2.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A Calorimetria exploratória diferencial é uma técnica de caracterização que permite identificar transições endotérmicas e exotérmicas em função da temperatura decorrente de transições físicas ou de reações químicas, podendo ser determinadas a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ), e variações de entalpia relacionadas a fusão, cristalização, vaporização, solidificação e adsorção. A transição vítrea ( $T_g$ ) é um importante efeito térmico que pode ser utilizado para a caracterização de plásticos e outros materiais amorfos ou semicristalinos. Na  $T_g$  ocorre a passagem do estado vítreo do material para um estado maleável, sem ocorrência de uma mudança estrutural. Abaixo da  $T_g$  o material não tem energia interna suficiente para permitir o deslocamento de uma cadeia com relação a outra (Canevarolo, 2002).

As Figuras 26 a 29 apresentam os termogramas de DSC para o primeiro aquecimento dos biopolímeros obtidos nos ensaios com a *C. violaceum* no biorreator realizados sob limitação de nitrogênio ou fósforo a 30°C, pH 7 e 20 g·l<sup>-1</sup> de glicose.

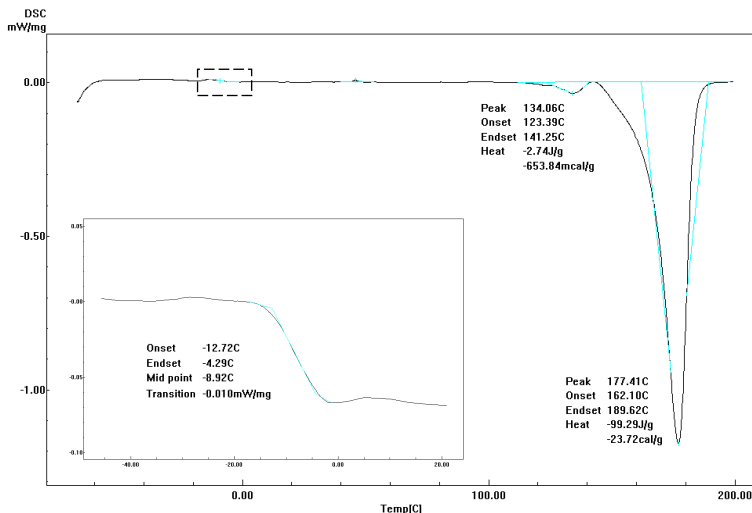


Figura 26 - Curva de DSC para o primeiro aquecimento do polímero sintetizado por *C. violaceum* sob limitação de nitrogênio a 30°C, pH 7, 20 g·l<sup>-1</sup> de glicose, sem adição de propionato (detalhe evidenciando  $T_g$ ).

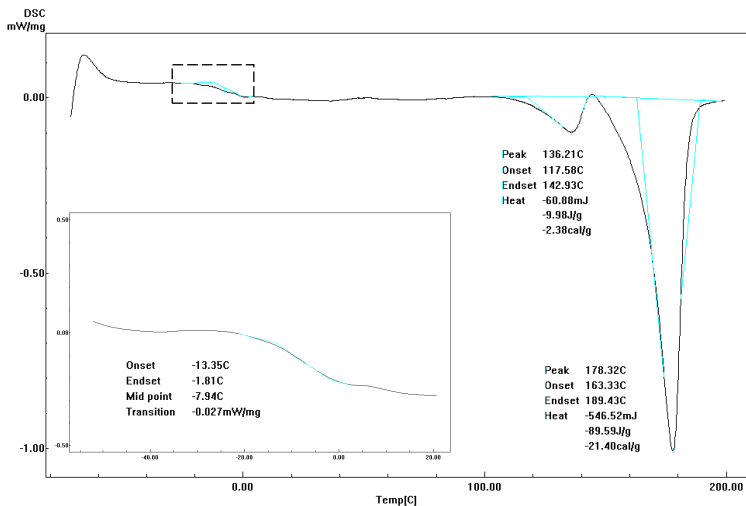


Figura 27 - Curva de DSC para o primeiro aquecimento do polímero sintetizado por *C. violaceum* sob limitação de nitrogênio a 30°C, pH 7, 20 g·l<sup>-1</sup> de glicose, com adição de 10 mM de propionato (detalhe evidenciando T<sub>g</sub>).

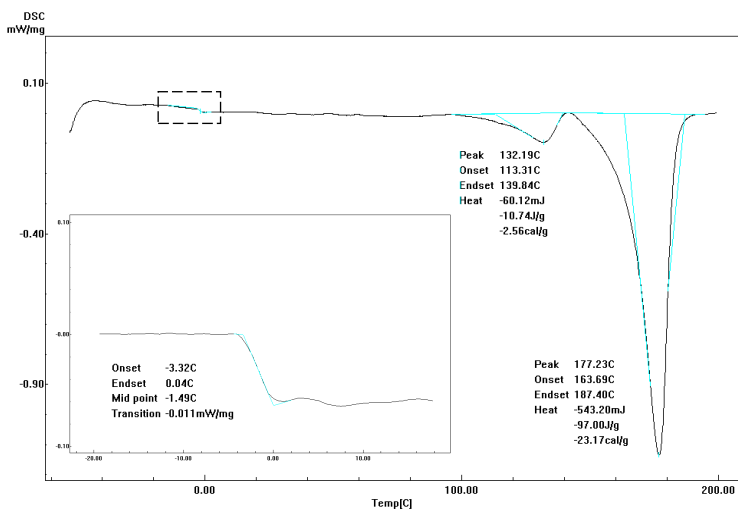


Figura 28 - Curva de DSC para o primeiro aquecimento do polímero sintetizado por *C. violaceum* sob limitação de fósforo a 30°C, pH 7, 20 g·l<sup>-1</sup> de glicose, sem adição de propionato (detalhe evidenciando T<sub>g</sub>).

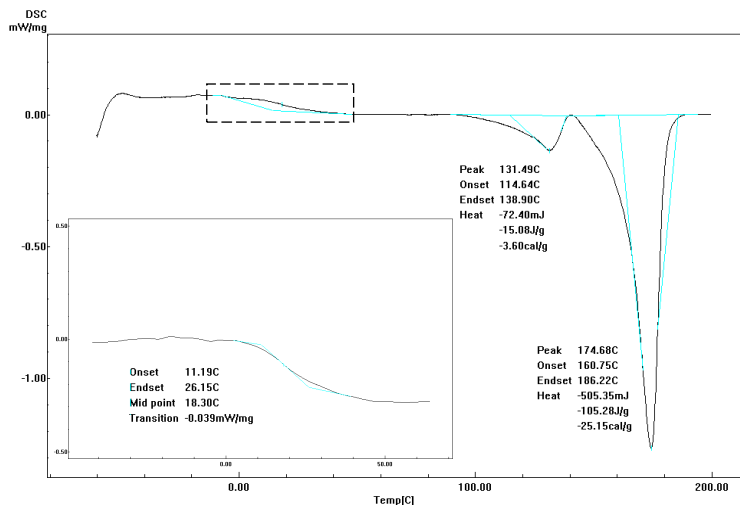


Figura 29 - Curva de DSC para o primeiro aquecimento do polímero sintetizado por *C. violaceum* sob limitação de fósforo a 30°C, pH 7, 20 g·l<sup>-1</sup> de glicose, com adição de 10 mL de propionato (detalhe evidenciando T<sub>g</sub>).

A Tabela 21 apresenta os valores para a fração de valerato nas amostras, a temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>), as temperaturas de fusão (T<sub>m</sub>), entalpias de fusão (ΔH<sub>m</sub>) e o grau de cristalinidade (χ<sub>c</sub>), obtidos por DSC das amostras de PHBV produzidas no biorreator.

Tabela 21 - Valores de temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>), temperatura de fusão (T<sub>m</sub>), entalpia de fusão (ΔH<sub>m</sub>) e grau de cristalinidade (χ<sub>c</sub>) obtidos por DSC para as amostras de PHBV sintetizadas por *Chromobacterium violaceum* a 30°C, pH 7 e concentração de glicose de 20 g·l<sup>-1</sup>.

Amostra	Nutriente Limitante	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)	ΔH <sub>m</sub> (J/g)	χ <sub>c</sub> (%)
PHB puro		-5,0 a 5,0	180	142,0	80
1	N	-8,9	177	99,3	70
2	N	-7,9	178	89,6	63
3	P	-1,5	177	97,0	68
4	P	18,3	174	105,3	74

Lee (1996a) observou que o ponto de fusão para o copolímero PHBV diminui com o aumento das unidades de 3HV incorporadas ao polímero, permitindo a sua processabilidade em uma faixa menor de temperatura. A análise dos valores de temperatura de fusão demonstra que, para os polímeros obtidos dos experimentos sob limitação de nitrogênio, a temperatura de fusão ( $T_m$ ) dos copolímeros permaneceu praticamente constante, pois a quantidade de valerato incorporado nas duas amostras é a mesma. Já sob limitação de fósforo, o aumento da fração de valerato de 3,12 para 4,64 g de HV em 100 gramas de polímero aumentou a temperatura de fusão em 3°C. Estes valores estão próximos a outros valores encontrados na literatura. Avella e colaboradores (2000) encontraram temperaturas de fusão entre 175 e 157°C para P(3HB-co-3HV) com fração de HV entre 0 e 11%. O copolímero P(3HB-co-71%HV) possui ponto de fusão de apenas 83°C (Sali e Blundell, 1993), enquanto que a incorporação de 13% de HV aumentou a temperatura de fusão para 168,4°C (Zagar e Krzan, 2004).

A presença de um segundo pico de fusão em uma temperatura inferior ( $T \sim 135^\circ\text{C}$ ) é característico dos PHAs. Comportamentos de fusões múltiplas de um polímero estão geralmente relacionados à fusão de cristais com espessuras lamelares diferentes ou diferentes estruturas cristalinas (Gunaratne et al., 2004).

A incorporação de unidades de valerato ao copolímero diminui a temperatura de transição vítrea, permitindo um maior deslocamento das cadeias a temperaturas mais baixas, tornando o material mais flexível. Dados da literatura indicam que a  $T_g$  do homopolímero PHB varia entre -5°C a 5°C (Anderson e Dawes, 1990). Uma variação da fração de HV entre 0 e 11% provocou uma diminuição dos valores da  $T_g$  de 9 para 2°C. No caso dos polímeros sintetizados nos ensaios em biorreator, os dados da Tabela 21 mostram que a relação direta entre o aumento da fração de valerato e a diminuição da  $T_g$  não foi obedecida. Para o caso do copolímero obtido com uma fração de 3,12 % de HV, a elevada  $T_g$  do polímero (18,23°C) pode ser resultado de algum resíduo resultante do processo de extração do material.

Nas curvas de DSC, as áreas sob os picos são tomadas como proporcionais às variações de entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ). Através da relação entre o valor medido e o valor teórico de uma situação ideal, em que se supõe o polímero como 100% cristalino, é possível calcular o grau de cristalinidade ( $\chi_c\%$ ) de um polímero (Schneider, 2006). Os graus de cristalinidade obtidos para os copolímeros foram calculados em função do PHB, tendo em vista que a entalpia de fusão para o PHB puro

é de  $142 \text{ J.g}^{-1}$  (Tsuiji e Ikada, 1996). Da Tabela 21 pode-se perceber que o grau de cristalinidade para os ensaios realizados em biorreator variou entre 63 e 74%. A diminuição da cristalinidade está associada ao aumento da fração de unidades de valerato ao copolímero. Savenkova e colaboradores (2000), utilizando *Azotobacter chroococcum*, obtiveram uma diminuição da cristalinidade de 63% para 31% quando a fração de valerato no copolímero aumentou de 0 para 20 %.

### 5.2.4 Análise termogravimétrica (TGA)

A utilização de técnicas de análise térmica, como DSC e TGA, auxiliam na observação das alterações nas propriedades do material antes e depois da degradação. A análise termogravimétrica (TGA) fornece as temperaturas de início de degradação ( $T_i$ ) e temperatura máxima de degradação ( $T_{\text{pico}}$ ), onde é possível avaliar a degradação térmica e a perda de massa dos polímeros (Schneider, 2006).

As Figuras 30 a 33 apresentam as curvas termogravimétricas para as amostras de biopolímeros obtidos nos ensaios em biorreator com a *C. violaceum* a  $30^\circ\text{C}$ , pH 7 e  $20 \text{ g.l}^{-1}$  de glicose.

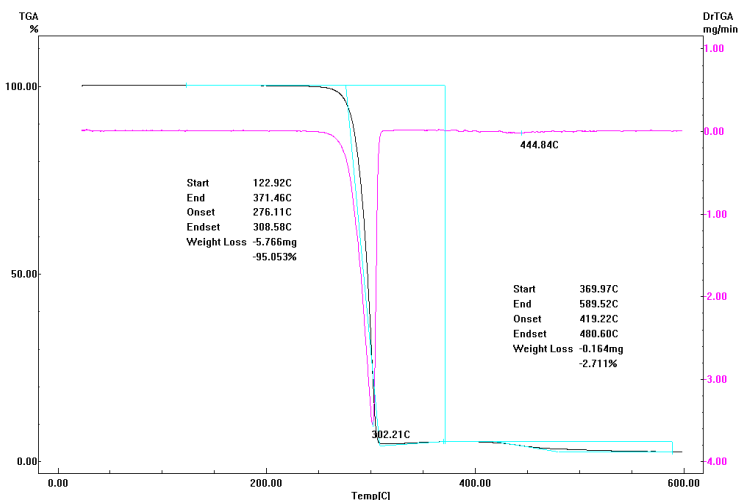


Figura 30 - Curva termogravimétrica do polímero sintetizado por *C. violaceum* sob limitação de nitrogênio a  $30^\circ\text{C}$ , pH 7,  $20 \text{ g.l}^{-1}$  de glicose, sem adição de propionato.

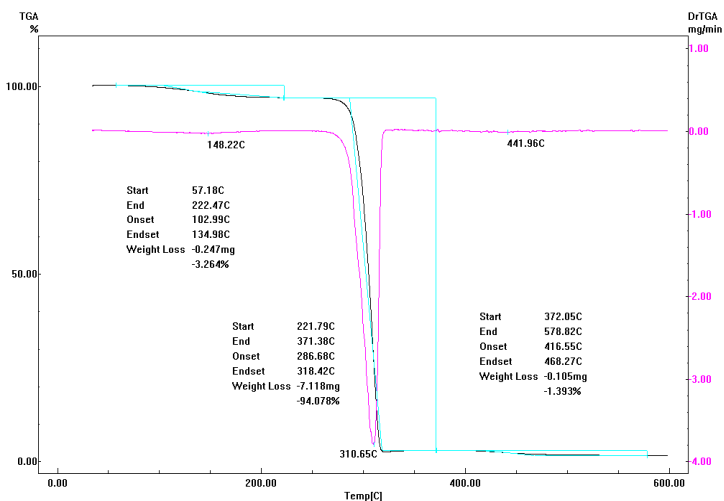


Figura 31 - Curva termogravimétrica do polímero sintetizado por *C. violaceum* sob limitação de nitrogênio a 30°C, pH 7, 20 g·l<sup>-1</sup> de glicose, com adição de 10 mM de pionato.

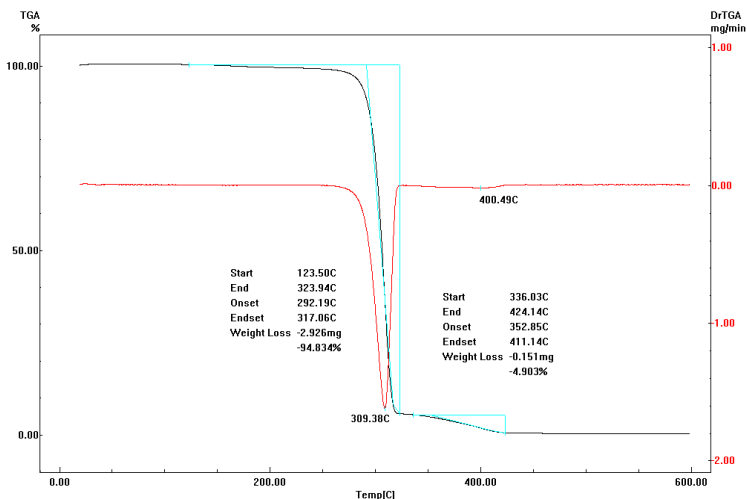


Figura 32 - Curva termogravimétrica do polímero sintetizado por *C. violaceum* sob limitação de fósforo a 30°C, pH 7, 20 g·l<sup>-1</sup> de glicose, sem adição de pionato.

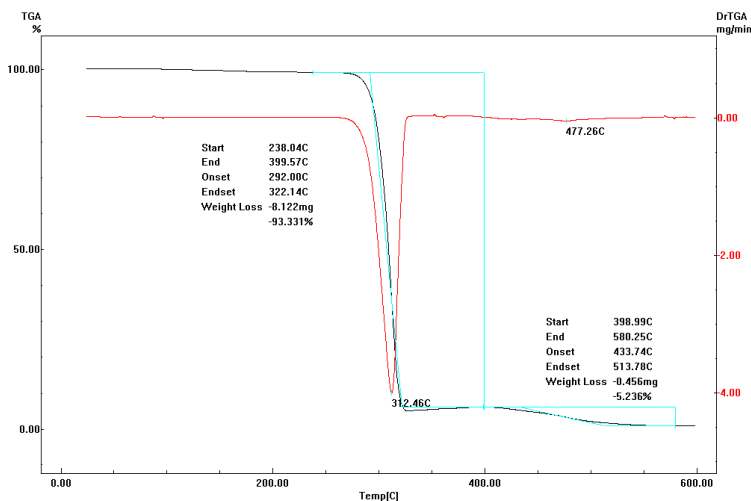


Figura 33 - Curva termogravimétrica do polímero sintetizado por *C. violaceum* sob limitação de fósforo a 30°C, pH 7, 20 g·l<sup>-1</sup> de glicose, com adição de 10 mM de propionato.

A Tabela 22 apresenta os resultados para a temperatura inicial de perda de massa ( $T_i$ ) e temperatura máxima de perda de massa ( $T_{pico}$ ) dos polímeros produzidos por *C. violaceum* nos quatro experimentos realizados. A  $T_{pico}$  foi determinada a partir da primeira derivada da análise termogravimétrica (TGA).

Tabela 22 - Dados de TGA para temperatura inicial de perda de massa ( $T_i$ ) e temperatura máxima de degradação térmica ( $T_{pico}$ ) dos copolímeros PHBV obtidos de *C. violaceum* a 30°C, pH 7 e concentração de glicose de 20 g·l<sup>-1</sup>.

Amostra	Nutriente Limitante	$T_i$ (°C)	$T_{pico}$ (°C)
PHB puro		265	278
1	N	276	302
2	N	287	310
3	P	292	309
4	P	292	312



Para o homopolímero PHB, as temperaturas inicial e máxima de degradação estão em 265°C e 278°C, respectivamente (Vanin et al., 2004). A incorporação de unidades de valerato ao copolímero aumenta a sua temperatura inicial e máxima de degradação, como pode ser observada na Tabela 22, onde as maiores temperaturas iniciais de degradação térmica estão relacionadas ao aumento da quantidade da fração de HV no polímero, o que melhora a sua processabilidade e favorece a sua aplicação nos processos de extração.

A análise dos termogramas mostra que, sob limitação de nitrogênio, apesar da quantidade de HV nos polímeros ter sido praticamente igual, com a utilização de propionato a temperatura inicial de degradação aumentou em 11°C, enquanto a temperatura máxima de degradação ( $T_{\text{pico}}$ ) aumentou de 302°C para 310°C. Este aumento de 8°C na temperatura máxima de degradação melhora a estabilidade térmica do polímero. Já sob limitação de fósforo, a utilização de 10 mM de propionato melhorou em apenas 3°C a temperatura de degradação máxima, apesar de ter diminuído a fração de HV no polímero. Quanto a pureza, analisada pela quantidade de massa degradada durante a análise térmica, foram obtidos percentuais de copolímero puro acima de 95%.



# CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

Este trabalho teve por objetivo analisar sistematicamente as condições de produção do copolímero poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) em *Chromobacterium violaceum* em agitador orbital e biorreator de bancada, analisando a influência do pH, do nutriente limitante, da concentração do substrato (glicose) e da adição de propionato, caracterizando os polímeros obtidos quanto a sua composição e propriedades físico-químicas. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- A *C. violaceum* foi capaz de biossintetizar o copolímero PHBV em todas as condições testadas nos ensaios em frascos agitados, utilizando apenas glicose como fonte de carbono, incorporando um máximo de 15,4% de unidades de valerato, com exceção de um dos ensaios, onde esta incorporação não foi observada.
- A formação do homopolímero PHB foi observada em um dos experimentos quando 10 g·l<sup>-1</sup> de glicose foram utilizados (em pH iniciais 6 e 7), acumulando apenas unidades de 3-hidroxi butirato.
- Nos ensaios realizados em agitador orbital, a incorporação de HV foi mais acentuada sob limitação de fósforo, acumulando até 11,5 gramas de valerato em 100 gramas de PHBV utilizando 30 g·l<sup>-1</sup> de glicose e pH inicial 6, apesar de produzir uma quantidade menor de biomassa e de polímero.
- Quando 10 mM de propionato foi utilizado nos ensaios em agitador orbital, a fração acumulada de HV aumentou em todas as condições testadas, obtendo-se um máximo de 23,8% utilizando 30 g·l<sup>-1</sup> de glicose e pH inicial 6 sob limitação de fósforo. Quando ácido propiônico é utilizado como co-substrato, observa-se uma diminuição da quantidade de biomassa formada.
- O máximo acúmulo de copolímero obtido foi de 70% ( $\frac{g_{PHBV}}{g_{biomassa}}$ ) em pH inicial 7, 10 g·l<sup>-1</sup> de glicose e 10 mM de propionato, tanto para os ensaios com limitação em nitrogênio,

quanto limitação em fósforo. O mesmo valor foi observado quando se utilizou concentração de glicose de 30 g·l<sup>-1</sup>.

- De um modo geral não se pode afirmar que o aumento na concentração de glicose cause inibição na produção de biomassa, nem que o aumento da concentração de substrato induza a um aumento no acúmulo de biopolímero, conforme sugerido pelos dados da literatura.
- pH mais baixo favorece a incorporação de unidades de valerato ao copolímero, embora a diminuição do pH inicial de 7 para 6 em ambas as condições de limitação (N e P) nos ensaios em agitador orbital tenha resultado em condições de crescimento desfavoráveis para a *C. violaceum* (redução da formação de biomassa).
- Propõe-se que o controle do pH e da aeração sobre as condições de cultivo no biorreator são determinantes para o grau de acúmulo de unidades de valerato pela *C. violaceum*.
- Sob limitação de fósforo, em biorreator de 4 litros, sob controle de pH e aeração, a adição de propionato diminui a incorporação de unidades de valerato ao copolímero.
- O aumento da fração de valerato nos copolímeros obtidos altera suas propriedades físico-químicas, diminuindo sua cristalinidade e aumentando sua estabilidade térmica. A variação das temperaturas de fusão e degradação térmica máxima demonstrou que a incorporação de unidades de valerato à amostra melhorou as características térmicas dos copolímeros obtidos.

A partir dos resultados obtidos, sugere-se que sejam realizados os seguintes experimentos:

- Ensaios em biorreator de bancada sem o controle de pH para determinar o aumento da incorporação das unidades de valerato ao copolímero.
- Ensaios em biorreator de bancada com alta densidade celular visando aumentar a produtividade do copolímero.
- Ensaios de caracterização biológica do material produzido, visando determinar características de biocompatibilidade em tecidos e/ou culturas de células.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Adonai, M. (2007). Comunicação Pessoal. Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí/SC.

Agus, J.; Kahar, P.; Abe, H.; Doi, Y. e Tsuge, T. (2006). Molecular weight characterization of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] synthesized by genetically engineered strains of *Escherichia coli*. **Polymer Degradation and Stability**, 91, 5, 1138-1146.

Ahn, W.S.; Park, S.J. e Lee, S.Y. (2001). Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, 23, 3, 235-240.

Anderson, A.J. e Dawes, E.A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology Reviews**, 54, 4, 450-472.

Andrighetti-Frohner, C.R.; Antônio, R.V.; Creczynski-Pasa, T.B.; Barardi, C.R. e Simoes, C.M. (2003). Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 98, 6, 843-848.

Angelova, N. e Hunkeler, D. (1999). Rationalizing the design of polymeric biomaterials. **Trends in Biotechnology**, 17, 10, 409-421.

Antônio, R.V. e Creczynski-Pasa, T.B. (2004). Genetic analysis of violacein biosynthesis by *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and Molecular Research**, 3, 1, 85-91.

Aragão, G.M.F.; Lindley, N.D.; Uribebarrea, J.L. e Pareilleux, A. (1996). Maintaining a controlled residual growth capacity increases the production of polyhydroxyalkanoate copolymers by *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology Letters**, 18, 8, 937-942.

Avella, M.; Martuscelli, E. e Raimo, M. (2000). Review Properties of blends and composites based on poly(3-hydroxybutyrate (PHB) and poly(3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) (PHBV) copolymers. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 35, 3, 523-545.

Barreto, E.S.; Torres, A.R.; Barreto, M.R.; Vasconcelos, A.T.; Astolfi-Filho, S. e Hungria, M. (2008). Diversity in antifungal activity of strains of *Chromobacterium violaceum* from the Brazilian Amazon. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 35, 7, 783-790.

Becker, S. (2008). **Análise Estrutural e Caracterização Funcional de Genes de Patogenicidade em *Chromobacterium violaceum*** (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 79 p.

Berg, J.M.; Tymoczko, J.L. e Stryer, L. (2007). **Biochemistry**. New York: W.H. Freeman. 1059 p.

Brandl, H.; Gross, R.A.; Lenz, R.W. e Fuller, R.C. (1988). Pseudomonas-Oleovorans as a Source of Poly(Beta-Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters. **Applied and Environmental Microbiology**, 54, 8, 1977-1982.

Braunegg, G.; Lefebvre, G. e Genser, K.F. (1998). Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, 65, 2-3, 127-161.

Braunegg, G.; Sonnleitner, B. e Lafferty, R.M. (1978). Rapid Gas-Chromatographic Method for Determination of Poly-Beta-Hydroxybutyric Acid in Microbial Biomass. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, 6, 1, 29-37.

Brazilian National Genome Project Consortium (2003). The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 100, 20, 11660-11665.

- Bressan, C.R. (2007). **Clonagem gênica, expressão heteróloga e proposição de um modelo estrutural teórico para a polihidroxicanoato sintase de *Chromobacterium violaceum*** (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 75 p.
- Breuer, U.; Terentiev, Y.; Kunze, G. e Babel, W. (2002). Yeasts as Producers of Polyhydroxyalkanoates: Genetic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Macromolecular Bioscience**, 2, 8, 380-386.
- Buffoni, E.; Gomez, R.S. e Silva, L.F. (2005). Avaliação da Composição de Polímeros Biodegradáveis Produzidos por *Burkholderia sacchari* a partir de Diferentes Substratos. **XV Simpósio Nacional de Bioprocessos**. Recife/Brasil.
- Byron, D. (1987). Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. **Trends in Biotechnology**, 5, 246-250.
- Campbell, S.C.; Olson, G.J.; Clark, T.R. e Mcfeters, G. (2001). Biogenic production of cyanide and its application to gold recovery. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 26, 3, 134-139.
- Canevarolo, S.V. (2002). **Ciência dos Polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. São Paulo: ArtLiber Editora. 183 p.
- Carminatti, C.A.; Oliveira, I.L.D.; Recouvreur, D.O.S.; Antônio, R.V. e Porto, L.M. (2008). Anthranilate synthase subunit organization in *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and Molecular Research**, 7, 3, 830-838.
- Chen, G.Q. e Wu, Q. (2005). The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. **Biomaterials**, 26, 33, 6565-6578.
- Choi, J.I. e Lee, S.Y. (1999a). Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. **Biotechnology and Bioengineering**, 62, 5, 546-553.
- Choi, J.I. e Lee, S.Y. (1999b). High-level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, 65, 10, 4363-4368.

Choi, J.I. e Lee, S.Y. (2000). Economic considerations in the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by bacterial fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 53, 6, 646-649.

Choi, J.I.; Lee, S.Y. e Han, K. (1998). Cloning of the *Alcaligenes latus* polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use of these genes for enhanced production of Poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, 64, 12, 4897-4903.

Da Silva, L.F.; Gomez, J.G.C.; Rocha, R.C.S.; Taciro, M.K. e Pradella, J.G.D. (2007). Biotechnological production of polyhydroxyalkanoates in Brazil for biodegradable polymers. **Quimica Nova**, 30, 7, 1732-1743.

De Oliveira, V.C.; Maeda, I.; Delessert, S. e Poirier, Y. (2004). Increasing the carbon flux toward synthesis of short-chain-length--medium-chain-length polyhydroxyalkanoate in the peroxisome of *Saccharomyces cerevisiae* through modification of the beta-oxidation cycle. **Applied and Environmental Microbiology**, 70, 9, 5685-5687.

Doi, Y.; Kanesawa, Y.; Kunioka, M. e Saito, T. (1990). Biodegradation of Microbial Copolyesters - Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) and Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-4-Hydroxybutyrate). **Macromolecules**, 23, 1, 26-31.

Doi, Y.; Kitamura, S. e Abe, H. (1995). Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate). **Macromolecules**, 28, 14, 4822-4828.

Du, G.C.; Chen, J.; Yu, J. e Lun, S. (2001). Feeding strategy of propionic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha*. **Biochemical Engineering Journal**, 8, 2, 103-110.

Duran, N. e Menck, C.F.M. (2001). *Chromobacterium violaceum*: A Review of Pharmacological and Industrial Perspectives. **Critical Reviews in Microbiology**, 27, 3, 201-222.

Goudel, A.M. (2005). **Criação da Base de Dados Via/Genoma da *Chromobacterium violaceum* - CvioCyc e Análise das Informações Geradas pelo Software Pathway Tools** (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 183 p.



Gourson, C.; Benhaddou, R.; Granet, R.; Krausz, P.; Verneuil, B.; Branland, P.; Chauvelon, G.; Thibault, J.F. e L., S. (1999). Valorization of maize bran to obtain biodegradable plastic films. **Journal of Applied Polymer Science**, 74, 13, 3040-3045.

Gunaratne, L.M.W.K.; Shanks, R.A. e Amarasinghe, G. (2004). Thermal history effects on crystallization and melting of poly(3-hydroxybutyrate). **Thermochimica Acta**, 423, 1-2, 127-135.

Huisman, G.W.; Wonink, E.; Meima, R.; Kazemier, B.; Terpstra, P. e Witholt, B. (1991). Metabolism of Poly(3-Hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans* - Identification and Sequences of Genes and Function of the Encoded Proteins in the Synthesis and Degradation of PHA. **Journal of Biological Chemistry**, 266, 4, 2191-2198.

Hungria, M.; Astolfi-Filho, S.; Chueire, L.M.O.; Nicol; Aacute; S, M.F.; Santos, E.B.P.; Bulbol, M.R.; Souza-Filho, A.; Nogueira, A.; Ccedil; Atilde; O, E.; Germano, M.G. e Vasconcelos, A.T.R. (2005). Genetic characterization of *Chromobacterium* isolates from black water environments in the Brazilian Amazon. **Letters in Applied Microbiology**, 41, 17-23.

Kansiz, M.; Billman-Jacobe, H. e Mcnaughton, D. (2000). Quantitative determination of the biodegradable polymer Poly(beta-hydroxybutyrate) in a recombinant *Escherichia coli* strain by use of mid-infrared spectroscopy and multivariate statistics. **Applied and Environmental Microbiology**, 66, 8, 3415-3420.

Kek, Y.-K.; Lee, W.-H. e Sudesh, K. (2008). Efficient bioconversion of palm acid oil and palm kernel acid oil to poly(3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator*. **Canadian Journal of Chemistry**, 86, 533-539.

Khanna, S. e Srivastava, A.K. (2005). Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. **Process Biochemistry**, 40, 6, 2173-2182.

Kim, B.S.; Lee, S.C.; Lee, S.Y.; Chang, H.N.; Chang, Y.K. e Woo, S.I. (1994). Production of Poly(3-Hydroxybutyric-co-3-Hydroxyvaleric Acid) by Fed-Batch Culture of *Alcaligenes eutrophus* with Substrate Control Using Online Glucose Analyzer. **Enzyme and Microbial Technology**, 16, 7, 556-561.

Kocer, H.; Borcakli, M.; Demirel, S. e Hazer, B. (2003). Production of bacterial polyesters from some various new substrates by *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas oleovorans*. **Turkish Journal of Chemistry**, 27, 3, 365-373.

Kolibachuk, D.; Miller, A. e Dennis, D. (1999). Cloning, molecular analysis, and expression of the polyhydroxyalkanoic acid synthase (phaC) gene from *Chromobacterium violaceum*. **Applied and Environmental Microbiology**, 65, 8, 3561-3565.

Kose, G.T.; Kenar, H.; Hasirci, N. e Hasirci, V. (2003). Macroporous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) matrices for bone tissue engineering. **Biomaterials**, 24, 11, 1949-1958.

Kusaka, S.; Abe, H.; Lee, S.Y. e Doi, Y. (1997). Molecular mass of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] produced in a recombinant *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 47, 2, 140-143.

Kusaka, S.; Iwata, T. e Doi, Y. (1999). Properties and biodegradability of ultra-high-molecular-weight poly[(R)-hydroxybutyrate] produced by a recombinant *Escherichia coli*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 25, 1-3, 87-94.

Lee, S.Y. (1996a). Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, 49, 1, 1-14.

Lee, S.Y. (1996b). Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Trends in Biotechnology**, 14, 11, 431-438.

Leon, L.L.; Miranda, C.C.; De Souza, A.O. e Duran, N. (2001). Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 48, 3, 449-450.

Li, R.; Zhang, H. e Qi, Q. (2007). The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, 98, 12, 2313-2320.

Li, X.T.; Zhang, Y. e Chen, G.Q. (2008). Nanofibrous polyhydroxyalkanoate matrices as cell growth supporting materials. **Biomaterials**, 29, 27, 3720-3728.

- Liebergesell, M.; Rahalkar, S. e Steinbüchel, A. (2000). Analysis of the *Thiocapsa pfennigii* polyhydroxyalkanoate synthase: subcloning, molecular characterization and generation of hybrid synthases with the corresponding *Chromatium vinosum* enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 54, 2, 186-194.
- Luengo, J.M.; Garcia, B.; Sandoval, A.; Naharro, G. e Olivera, E.R. (2003). Bioplastics from microorganisms. **Current Opinion in Microbiology**, 6, 3, 251-260.
- Madison, L.L. e Huisman, G.W. (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 63, 1, 21-53.
- Mahishi, L.H.; Tripathi, G. e Rawal, S.K. (2003). Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* harbouring *Streptomyces aureofaciens* PHB biosynthesis genes: effect of various carbon and nitrogen sources. **Microbiological Research**, 158, 1, 19-27.
- Marangoni, C.; Furigo, A. e De Aragao, G.M.F. (2000). Oleic acid improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Ralstonia eutropha* in inverted sugar and propionic acid. **Biotechnology Letters**, 22, 20, 1635-1638.
- Marangoni, C.; Furigo, A. e De Aragdo, G.M.F. (2002). Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding. **Process Biochemistry**, 38, 2, 137-141.
- Marangoni, C.; Furigo Jr, A. e Aragão, G.M.F. (2001). The influence of substrate source on the growth of *Ralstonia eutropha*, aiming at the production of polyhydroxyalkanoate. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 18, 2, 175-180.
- Mccool, G.J. e Cannon, M.C. (2001). PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*. **Journal of Bacteriology**, 183, 14, 4235-4243.
- Mendes, A.; De Carvalho, J.; Duarte, M.; Durán, N. e Bruns, R. (2001). Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production. **Biotechnology Letters**, 23, 23, 1963-1969.

Mendes, E. (2006). **Uso Racional de Ferramentas de Engenharia Metabólica: Produção Bacteriana de Hidrogênio e de Violaceína** (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 119 p.

Mergaert, J.; Schirmer, A.; Hauben, L.; Mau, M.; Hoste, B.; Kersters, K.; Jendrossek, D. e Swings, J. (1996). Isolation and identification of poly(3-hydroxyvalerate)-degrading strains of *Pseudomonas lemoignei*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 46, 3, 769-773.

Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, 31, 3, 426-428.

Mitomo, H.; Takahashi, T.; Ito, H. e Saito, T. (1999). Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) produced by *Burkholderia cepacia* D1. **International Journal of Biological Macromolecules**, 24, 4, 311-318.

Ojumu, T.V.; Yu, J. e Solomon, B.O. (2004). Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. **African Journal of Biotechnology**, 3, 1, 18-24.

Oliveira, C.G. (2005). **Regulação Gênica da Biossíntese de Violaceína e Quorum sensing em *Chromobacterium violaceum*** (Tese). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 159 p.

Oliveira, R.P. (1999). **Produção de Poli-3-hidroxibutirato (P(3HB)) por *Ralstonia eutropha* em substrato de baixo custo: estudo de diferentes estratégias de limitação de crescimento** (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 127 p.

Piemolini, L.T. (2004). **Modelagem Estrutural da PHA Sintase de *Chromobacterium violaceum* para Estudos de Mutação Sítio-Dirigida** (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 91 p.

Pitlovanciv, A.K. (2005). **Atividade Antibiótica de Extratos Obtidos de Culturas de *Chromobacterium violaceum*** (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 93 p.

Poirier, Y. (2002). Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism. **Progress in Lipid Research**, 41, 2, 131-155.

Potter, M.; Muller, H.; Reinecke, F.; Wieczorek, R.; Fricke, F.; Bowien, B.; Friedrich, B. e Steinbüchel, A. (2004). The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*. **Microbiology**, 150, 7, 2301-2311.

Potter, M. e Steinbüchel, A. (2005). Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. **Biomacromolecules**, 6, 2, 552-560.

Ramsay, B.A.; Lomaliza, K.; Chavarie, C.; Dube, B.; Bataille, P. e Ramsay, J.A. (1990). Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids. **Applied and Environmental Microbiology**, 56, 7, 2093-2098.

Recouvreux, D.O.S. (2004). **Produção de Celulose Bacteriana: Identificação do Operon bcs e Produção de Biofilme Celulósico por *Chromobacterium violaceum*** (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 134 p.

Recouvreux, D.O.S.; Carminatti, C.A.; Pitlovanciv, A.K.; Rambo, C.R.; Porto, L.M. e Antônio, R.V. (2008). Cellulose Biosynthesis by the Beta-Proteobacterium *Chromobacterium violaceum*. **Current Microbiology**, 57, 5, 469-476.

Reddy, C.S.K.; Ghai, R.; Rashmi e Kalia, V.C. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, 87, 2, 137-146.

Rehm, B.H. (2003). Polyester synthases: natural catalysts for plastics. **Biochemical Journal**, 376, 1, 15-33.

Rehm, B.H.A. e Steinbüchel, A. (1999). Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, 25, 1-3, 3-19.

Rettori, D. (1996). **Produção, Extração e Purificação da Violaceína: um Antibiótico Produzido pela *Chromobacterium violaceum*** (Mestrado). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 44 p.

Reusch, R.N. (1995). Low molecular weight complexed poly(3-hydroxybutyrate): a dynamic and versatile molecule in vivo. **Canadian Journal of Microbiology**, 41 Suppl 1, 50-54.

Reusch, R.N. e Sadoff, H.L. (1988). Putative structure and functions of a poly-beta-hydroxybutyrate/calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 85, 12, 4176-4180.

Richards, C. (1993). *Chromobacterium violaceum*, opportunistic pathogenic bacteria isolated in tropical and subtropical areas. **Bulletin Société de Pathologie Exotique**, 86, 3, 197-224.

Rodrigues, A.L. (2007). **Produção Heteróloga de Violaceína por *Escherichia coli* Expressando o Operon *vioABCDE* de *Chromobacterium violaceum* sob Controle do Promotor *araBAD*** (Dissertação). Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 120 p.

Rossi, S.; Azghani, A.O. e Omri, A. (2004). Antimicrobial efficacy of a new antibiotic-loaded poly(hydroxybutyric-co-hydroxyvaleric acid) controlled release system. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 54, 6, 1013-1018.

Sali, A. e Blundell, T.L. (1993). Comparative Protein Modeling by Satisfaction of Spatial Restraints. **Journal of Molecular Biology**, 234, 3, 779-815.

Savenkova, L.; Gercberga, Z.; Bibers, I. e Kalnin, M. (2000). Effect of 3-hydroxy valerate content on some physical and mechanical properties of polyhydroxyalkanoates produced by *Azotobacter chroococcum*. **Process Biochemistry**, 36, 5, 445-450.

Schneider, A.L.D.S. (2006). **Síntese, Caracterização e Biodegradação de Poli-3-Hidroxibutirato - P(3HB) de *Ralstonia Eutropha* e Blendas de P(3HB)/PCL (Poli-E-Caprolactona)** (Tese). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 220 p.

Shishatskaya, E.I. e Volova, T.G. (2004). A comparative investigation of biodegradable polyhydroxyalkanoate films as matrices for in vitro cell cultures. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine** 15, 8, 915-923.

Simão, E. (2006). **Redes de Regulação Gênica: Um Modelo Integrado da Regulação do Metabolismo do Triptofano em *Escherichia coli* sob o Formalismo de Redes de Petri** (Tese). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 160 p.

Slater, S.C.; Voige, W.H. e Dennis, D.E. (1988). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. **Journal of Bacteriology**, 170, 10, 4431-4436.

Smith, A.D. e Hunt, R.J. (1985). Solubilisation of gold by *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 35, 110-116.

Solaiman, D.K.; Ashby, R.D.; Licciardello, G. e Catara, V. (2008). Genetic organization of pha gene locus affects phaC expression, poly(hydroxyalkanoate) composition and granule morphology in *Pseudomonas corrugata*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 35, 2, 111-120.

Spier, V.C. (2005). **Caracterização espectroscópica e cromatográfica de copoliésteres biodegradáveis** (Dissertação). Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais, UDESC, Joinville, 66 p.

Squio, C.R. e Aragão, G.M.F. (2004). Cultivation strategies for production of the biodegradable plastics poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by bacteria. **Química Nova**, 27, 4, 615-622.

Squiao, C.R.; Marangoni, C.; De Vecchi, C.S. e Aragao, G.M.F. (2003). Phosphate feeding strategy during production phase improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) storage by *Ralstonia eutropha*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 61, 3, 257-260.

Steinbüchel, A.; Debzi, E.-M.; Marchessault, R.H. e Timm, A. (1993). Synthesis and production of poly(3-hydroxyvaleric acid) homopolyester by *Chromobacterium violaceum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 39, 4, 443-449.

Steinbüchel, A. e Fuchtenbusch, B. (1998). Bacterial and other biological systems for polyester production. **Trends in Biotechnology**, 16, 10, 419-427.

Steinbüchel, A.; Hustede, E.; Liebergesell, M.; Pieper, U.; Timm, A. e Valentin, H. (1992). Molecular-Basis for Biosynthesis and Accumulation of Polyhydroxyalkanoic Acids in Bacteria. **Fems Microbiology Reviews**, 103, 2-4, 217-230.

Steinbüchel, A. e Lutke-Eversloh, T. (2003). Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, 16, 2, 81-96.

Steinbüchel, A. e Schlegel, H.G. (1991). Physiology and molecular genetics of poly(beta-hydroxy-alkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. **Molecular Microbiology**, 5, 3, 535-542.

Stubbe, J.; Tian, J.; He, A.; Sinskey, A.J.; Lawrence, A.G. e Liu, P. (2005). Nontemplate-dependent polymerization processes: polyhydroxyalkanoate synthases as a paradigm. **Annual Review of Biochemistry**, 74, 433-480.

Sudesh, K.; Abe, H. e Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, 25, 10, 1503-1555.

Suriyamongkol, P.; Weselake, R.; Narine, S.; Moloney, M. e Shah, S. (2007). Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - a review. **Biotechnology Advances**, 25, 2, 148-175.



Thakor, N.; Trivedi, U. e Patel, K.C. (2005). Biosynthesis of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl-PHAs) by *Comamonas testosteroni* during cultivation on vegetable oils. **Bioresource Technology**, 96, 17, 1843-1850.

Timm, A. e Steinbüchel, A. (1990). Formation of Polyesters Consisting of Medium-Chain-Length 3-Hydroxyalkanoic Acids from Gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and Other Fluorescent *Pseudomonads*. **Applied and Environmental Microbiology**, 56, 11, 3360-3367.

Trotsenko, Y.A. e Belova, L.L. (2000). Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) and Its Regulation in Bacteria. **Microbiology**, 69, 6, 635-645.

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

Valentin, H.E.; Broyles, D.L.; Casagrande, L.A.; Colburn, S.M.; Creely, W.L.; Delaquil, P.A.; Felton, H.M.; Gonzalez, K.A.; Houmiel, K.L.; Lutke, K.; Mahadeo, D.A.; Mitsky, T.A.; Padgette, S.R.; Reiser, S.E.; Slater, S.; Stark, D.M.; Stock, R.T.; Stone, D.A.; Taylor, N.B.; Thorne, G.M.; Tran, M. e Gruys, K.J. (1999). PHA production, from bacteria to plants. **International Journal of Biological Macromolecules**, 25, 1-3, 303-306.

Vanin, M.; Santana, C.C.; Torrianiiii, Í.L.; Priveliciii, T. e Duek, E.A.R. (2004). Estudo da degradação *in vitro* de blendas de poli(b-hidroxibutirato) (PHB) / poli(L-ácido lático) (PLLA) na forma de filmes. **Polímeros**, 14, 3, 187-193.

Viegas, C.P.R. (2005). **Estudo da Produção de Polihidroxialcanoatos (PHAs) por *Chromobacterium violaceum*** (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil., 95 p.

Wang, F. e Lee, S.Y. (1997). 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**, 63, 9, 3703-3706.

Williams, S.F.; Martin, D.P.; Horowitz, D.M. e Peoples, O.P. (1999). PHA applications: addressing the price performance issue: I. Tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, 25, 1-3, 111-121.

Yasothea, K.; Aroua, M.K.; Ramachandran, K.B. e Tan, I.K.P. (2006). Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration. **Biochemical Engineering Journal**, 30, 3, 260-268.

Zagar, E. e Krzan, A. (2004). SEC-MALS characterization of microbial polyhydroxyalkanoates. **Biomacromolecules**, 5, 2, 628-636.

Zinn, M.; Witholt, B. e Egli, T. (2001). Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 53, 1, 5-21.

**Curvas de Correlação**



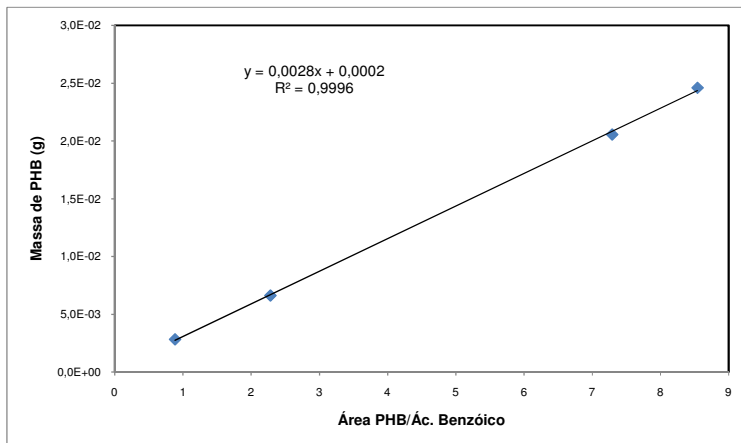


Figura 34 - Curva típica padrão para determinação da concentração de PHB.

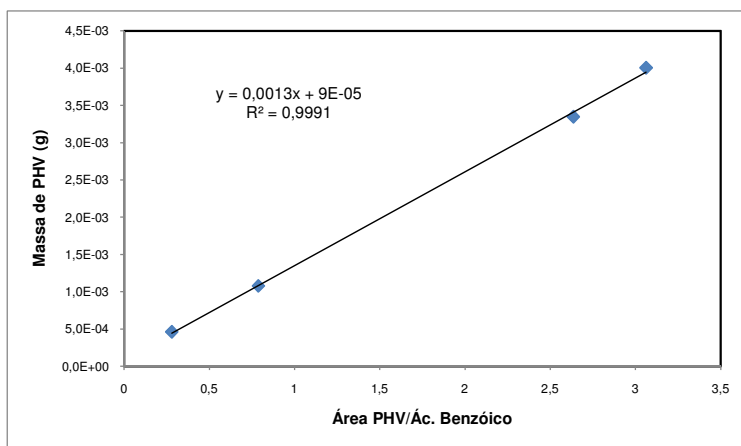


Figura 35 - Curva típica padrão para determinação da concentração de PHV.

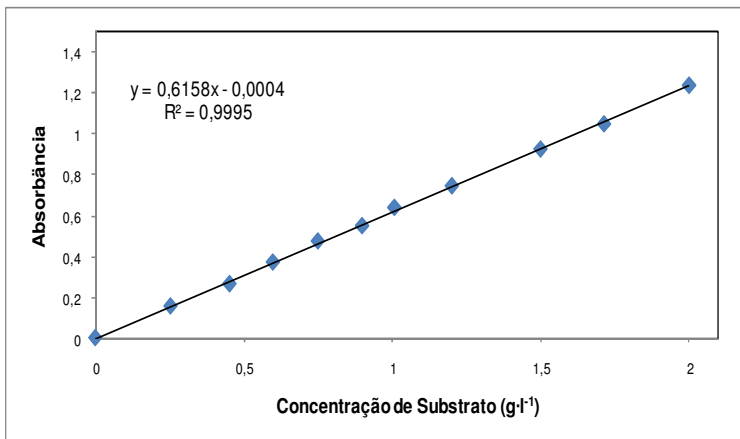


Figura 36 - Curva típica padrão para determinação da concentração de substrato.

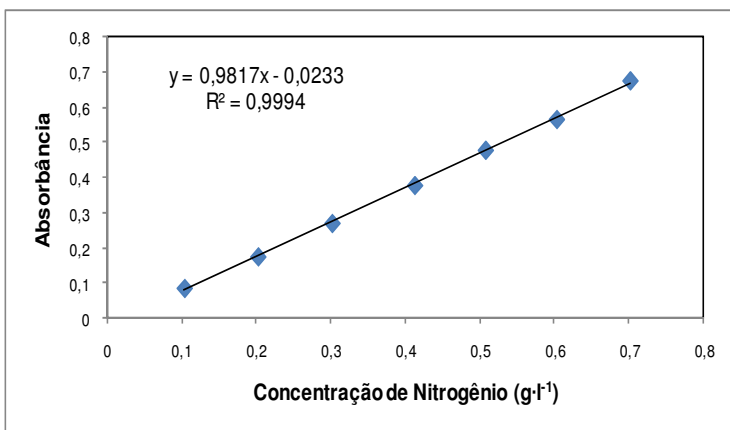


Figura 37 - Curva típica padrão para determinação da concentração de nitrogênio.

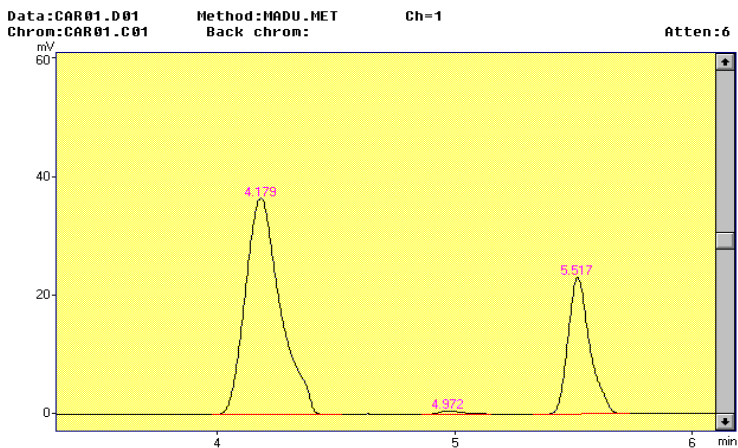


Figura 38 - Exemplo de cromatograma obtido da análise de CG para o polímero sintetizado por *Chromobacterium violaceum* em biorreator.