

ANDRÉIA LANGE DE PINHO NEVES

USO DE ENZIMAS NA EXTRAÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS SINTETIZADOS POR
Cupriavidus necator

FLORIANÓPOLIS – SC

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E DE ALIMENTOS

USO DE ENZIMAS NA EXTRAÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS SINTETIZADOS POR
Cupriavidus necator

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

Orientador: Prof. Dr. José Miguel Müller

ANDRÉIA LANGE DE PINHO NEVES
Engenheira de Alimentos

Florianópolis, 6 de março de 2009.

Dedico este trabalho à minha mãe e ao meu marido pelo amor incondicional, incentivo e credibilidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Miguel Müller, por todo empenho, sabedoria e compreensão. Gostaria de ratificar a sua competência e participação com discussões, correções e sugestões que fizeram com que concluíssemos este trabalho.

À todos os professores e funcionários que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa Dissertação de Mestrado.

Aos amigos do Laboratório de Engenharia Bioquímica pela amizade, incentivo e auxílio durante todo o trabalho.

Aos colegas do Mestrado pela excelente relação pessoal que criamos e nunca irá se perder.

À minha família, que mesmo distante, sempre me apoiou e me deu forças com suas orações e muito amor.

Ao meu amor Alarico, pelo infinito carinho, por estar sempre me apoiando nas horas difíceis e comemorando minhas vitórias.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
NOMENCLATURA	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Plásticos em geral.....	3
2.2 Polihidroxialcanoatos (PHA's).....	5
2.2.1 Poli(3-hidroxi butirato) (P(3HB)).....	6
2.2.2 Características e propriedades do P(3HB).....	7
2.3 Organismos produtores de polihidroxialcanoatos.....	8
2.3.1 <i>Cupriavidus necator</i>	8
2.3.2 <i>Alcaligenes latus</i>	9
2.3.3 <i>Azotobacter vinelandii</i>	9
2.3.4 Organismos metilotróficos.....	9
2.3.5 Bactéria do gênero <i>Pseudomonas</i>	10
2.3.6 Bactérias do gênero <i>Burkholderia</i>	10
2.3.7 <i>Escherichia coli</i>	10
2.3.8 Produtores transgênicos.....	11
2.3.8.1 Insetos.....	11
2.3.8.2 Plantas.....	11
2.4 Descrição geral de <i>Cupriavidus necator</i>	11
2.5 Biossíntese de P(3HB) por <i>Cupriavidus necator</i>	13
2.6 Biodegradação.....	14
2.7 Aplicações.....	16
2.8 Fatores que afetam o custo de produção.....	16
2.8.1 Substratos de baixo custo.....	17
2.8.2 Técnicas de extração e recuperação de PHA's.....	18
2.8.2.1 Uso de enzimas na extração de poli(3-hidroxi butirato).....	20
2.9 Separação industrial do polímero.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Microrganismo.....	24
3.2 Obtenção de células.....	24
3.2.1 Testes iniciais para a produção de biomassa de <i>Cupriavidus necator</i>	25
3.2.2 Influência de diferentes concentrações de uréia, KH_2PO_4 e Na_2HPO_4 na produção de biomassa de <i>Cupriavidus necator</i> e P(3HB).....	26
3.3 Técnicas analíticas.....	27
3.3.1 Amostragem.....	27
3.3.2 Determinação da concentração de biomassa.....	28
3.3.2.1 Medida por espectrofotometria.....	28
3.3.2.2 Medida por gravimetria.....	28
3.3.3 Concentração de açúcares.....	28
3.3.4 Quantificação de P(3HB).....	28
3.3.4.1 Cromatografia gasosa.....	29

3.3.5 Determinação da porcentagem de recuperação e pureza de P(3HB)	29
3.4 Metodologia de extração	30
3.4.1 Preparo das células para hidrólise	30
3.4.2 Procedimento de extração de polímero	30
3.4.3 Enzimas	31
3.4.3.1 Alcalase [®] 2.4L	31
3.4.3.2 Celumax [®] BC	32
3.4.3.3 Corolase [®] 7089	32
3.4.3.4 Corolase [®] L10	32
3.4.3.5 Corolase [®] PP	32
3.4.3.6 Protemax [®] FC	33
3.4.3.7 Rohalase [®] Barley	33
3.4.3.8 Rohalase [®] BX	33
3.4.3.9 Rohament [®] CL	34
3.5 Análise estatística	34
3.6 Influência do tipo de solvente e tempo de hidrólise sobre a extração de P(3HB)	34
3.7 Extração de P(3HB) com diferentes tipos de enzimas	35
3.6 Otimização das condições para atividade da enzima Celumax [®] BC	36
3.7 Avaliação do número de extrações de P(3HB) com diclorometano	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 Testes iniciais para a produção de biomassa de <i>Cupriavidus necator</i>	39
4.2 Influência de diferentes concentrações de uréia, KH ₂ PO ₄ e Na ₂ HPO ₄ na produção de biomassa de <i>Cupriavidus necator</i> e P(3HB)	41
4.3 Avaliação de diferentes condições de tratamento térmico	44
4.4 Influência do tipo de solvente e tempo de hidrólise sobre a extração de P(3HB)	45
4.5 Extração de P(3HB) após hidrólise enzimática com diferentes tipos de enzimas	47
4.6 Otimização das condições para atividade da enzima Celumax [®] BC	50
4.7 Análise de custos com enzimas	55
4.8 Avaliação do número de extrações de P(3HB) com diclorometano	57
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES	59
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXOS	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Variação da produção física da indústria de transformação de produtos plásticos selecionados (taxa acumulada nos últimos trimestres – IV/2006 a I/2008)	3
Figura 2 - Classificação de polímeros biodegradáveis.....	4
Figura 3 - Fórmula geral dos PHA's.....	6
Figura 4 - Parede celular de microrganismos Gram-negativos	12
Figura 5 - Grânulos de P(3HB) no interior das células de <i>Cupriavidus necator</i>	12
Figura 6 - Rotas metabólicas envolvidas na síntese de P(3HB) sob condição de crescimento balanceado e de excesso de carbono.....	14
Figura 7- Biociclo de produção e degradação de PHA's	15
Figura 8 - Fluxograma simplificado para extração de P(3HB) em escala industrial.....	22
Figura 9 - Decantador para extração líquido-líquido com alto teor de conteúdo de sólidos.....	22
Figura 10 - Fluxograma da extração de polímero	31
Figura 11 - Gráficos da análise do efeito das concentrações de glicose, uréia e oligoelementos sobre a produção de biomassa de <i>C. necator</i>	40
Figura 12 - Gráficos da análise do efeito das concentrações de uréia, KH_2PO_4 e Na_2HPO_4 sobre o crescimento celular de <i>C. necator</i>	43
Figura 13 - Gráficos da análise do efeito das concentrações de uréia, KH_2PO_4 e Na_2HPO_4 sobre o acúmulo de P(3HB) por <i>C. necator</i>	44
Figura 14 - Análise dos efeitos dos parâmetros pH, temperatura (T), concentração de enzima ([E]) e tempo (t) sobre a extração de P(3HB-co-3HV)	52
Figura 15 - Análise do efeito dos parâmetros pH, concentração de enzima ([E]) e tratamento térmico (T T) sobre a extração de P(3HB-co-3HV)	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre as características do P(3HB) e do polipropileno (PP).....	7
Tabela 2 - Composição do meio de cultura.....	25
Tabela 3 - Composição da solução concentrada de oligoelementos.....	25
Tabela 4 - Matriz do planejamento fatorial 2^3 de avaliação do crescimento de <i>Cupriavidus necator</i>	26
Tabela 5 - Níveis dos componentes utilizados no planejamento fatorial.....	26
Tabela 6 - Composição do meio de cultura.....	26
Tabela 7 - Matriz do planejamento fatorial 2^3 para uréia e sais.....	27
Tabela 8 - Níveis dos compostos variados no planejamento fatorial.....	27
Tabela 9 - Composição do álcool citrus.....	35
Tabela 10 - Solução tampão e pH para cada enzima.....	36
Tabela 11 - Matriz do planejamento fatorial 2^{4-1} sobre o efeito dos parâmetros pH, temperatura (T), concentração de enzima ([E]) e tempo (t) na ação da enzima Celumax [®] BC.....	37
Tabela 12 - Níveis dos parâmetros utilizados no primeiro planejamento fatorial.....	37
Tabela 13 - Matriz do planejamento fatorial 2^3 dos parâmetros: pH, concentração de enzima ([E]) e tratamento térmico (T T) para Celumax [®] BC.....	37
Tabela 14 - Níveis dos parâmetros utilizados no segundo planejamento.....	38
Tabela 15 - Biomassa para o planejamento fatorial de otimização das condições de cultivo de <i>C. necator</i>	39
Tabela 16 - Concentrações de biomassa e P(3HB) obtidas com o planejamento fatorial de otimização das condições de cultivo de <i>C. necator</i>	42
Tabela 17 - Porcentagem média de P(3HB-co-3HV) recuperado nas diferentes temperaturas.....	45
Tabela 18 - Porcentagem média de P(3HB) obtida após a extração com diferentes solventes e tempos de hidrólise com a enzima Alcalase [®] 2.4L.....	46
Tabela 19 - Porcentagem média de P(3HB) recuperado e análise estatística obtida após a extração com diferentes tipos de enzimas.....	48
Tabela 20 - Porcentagem média de P(3HB) e análise estatística das extrações realizadas com as enzimas Celumax [®] BC, Corolase [®] L10, Rohamen [®] CL e Alcalase [®] 2.4L.....	49
Tabela 21 - Dados do planejamento fatorial para otimização das condições de operação da enzima Celumax [®] BC e porcentagem média de P(3HB-co-3HV) recuperado.....	51
Tabela 22 - Dados do segundo planejamento fatorial para otimização das condições de operação da enzima Celumax [®] BC e porcentagem média de P(3HB-co-3HV) recuperado.....	53
Tabela 23 - Preço e recuperação de P(3HB) das enzimas.....	55
Tabela 24 - Porcentagens de extração com diferentes concentrações de enzimas.....	56
Tabela 25 - Retorno financeiro obtido com o P(3HB) extraído com 1 Kg de enzima nos diferentes ensaios.....	57
Tabela 26 - Extrações obtidas com diclorometano.....	58

NOMENCLATURA

Abs	Absorbância
ART	Açúcares redutores totais
ATP	Adenosina trifosfato
CoASH	Coenzima A
DMS	Diferença mínima significativa
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
Pa	Pascal
PCL	Poli(ϵ -prolactona)
PHA's	Poli(hidro)alcanoatos
PHB	Poli(β -hidroxibutirato)
P(3HB)	Poli(3-hidroxibutirato)
P(3HB- <i>co</i> -3HV)	Poli(3-hidroxibutirato- <i>co</i> -3-hidroxivalerato)
PLA	Ácido polilático
PP	Polipropileno
R ²	Coefficiente de correlação
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
T T	Tratamento térmico

RESUMO

O impacto ambiental causado pelo acúmulo de plásticos sintéticos, tem promovido interesse no desenvolvimento do poli(3-hidroxiбутirato), P(3HB), que é um biopolímero da família dos polihidroxiácidoalcanóatos (PHA's), sintetizado e acumulado como reserva de carbono e energia, por uma variedade de microrganismos. Este polímero é altamente biodegradável quando exposto a ambientes biologicamente ativos, o que o torna muito atraente como substituto de plásticos derivados do petróleo. Entretanto, sua aplicação ainda é limitada devido ao custo de produção elevado. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de novos processos de produção e extração do polímero a um custo mais baixo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de enzimas no processo de recuperação de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) sintetizados por *Cupriavidus necator*. A fim de se obter melhores condições de cultivo para produção de P(3HB) por *C. necator*, foram realizados ensaios com diferentes concentrações de glicose, uréia, solução de oligoelementos, KH_2PO_4 e Na_2HPO_4 . As células obtidas destes ensaios e de culturas em biorreator foram utilizadas nos experimentos de extração. Foram preparadas suspensões com 2% (p/v) de células com as quais testou-se diferentes tipos de solventes (álcool citrus, clorofórmio e diclorometano) e enzimas para extração de biopolímero. Realizou-se ainda, planejamentos experimentais de otimização das condições operacionais da enzima Celumax[®] BC. Em relação aos três solventes testados, o clorofórmio possibilitou maior extração de P(3HB) mostrando que o polímero é mais solúvel neste composto. Das nove enzimas avaliadas, Celumax[®] BC foi a que melhor provocou a lise da membrana celular da bactéria. Os resultados sobre a otimização das condições operacionais de Celumax[®] BC mostraram que a enzima é mais estável em tampão acetato com pH 4,0 e em banho a 60°C, o tempo de 1 h de hidrólise e a concentração de 0,02% (p/p) proporcionaram a lise da membrana da bactéria e alta extração de polímero. A recuperação de P(3HB) através da digestão enzimática foi de 94,5% e o filme apresentou 91% de pureza. Os experimentos preliminares em frascos agitados indicaram que *Cupriavidus necator* cresce melhor (9,9 g.L⁻¹) em meio com 40 g.L⁻¹ de glicose, 2 g.L⁻¹ de uréia e 15 mL.L⁻¹ de solução de oligoelementos. Já para produção de P(3HB), o planejamento mostrou que, com 2 g.L⁻¹ de uréia, 1,5 g.L⁻¹ de KH_2PO_4 e 0,6 g.L⁻¹ de Na_2HPO_4 a bactéria acumulou 70,4% de polímero. Os resultados indicam que o uso de enzimas para extração de polímeros é um processo eficiente, não havendo a necessidade de utilizar compostos químicos para auxiliar no rompimento das células de *Cupriavidus necator*.

Palavras-chave: *Cupriavidus necator*, poli(3-hidroxiбутirato), recuperação, enzimas.

ABSTRACT

The environmental impact caused by the accumulation of synthetic plastics, has promoted interest in the development of poly(3-hydroxybutyrate), P(3HB), which is a biopolymer of the polyhydroxyalcanoates family (PHA's), synthesized and stored as a reserve of carbon and energy, by a wide range of microorganisms. This polymer is highly biodegradable when it is exposed to biological active environments, which make it very attractive as a substitute for petroleum derived plastics. However, its application has been limited due the high cost of production. Therefore, it is necessary to develop new processes of production and recovery of the polymer with lower cost. This work was made with the aim to evaluate the use of enzymes in the process of recovery of P(3HB) and P(3HB-co-3HV) synthesized by *Cupriavidus necator*. In order to obtain better cultivation conditions to produce P(3HB) by *C. necator*, assays were performed with different concentrations of glucose, urea, solution of trace elements, KH_2PO_4 and Na_2HPO_4 . The cells obtained from these assays and from cultures in bioreactor were utilized on the extraction experiments. Solutions were prepared with 2% (w/v) of cells with which different types of solvents were tested (citrus alcohol, chloroform and dichloromethane) and enzymes for biopolymer extraction. Experimental planning was carried out to optimize the operating conditions of the enzyme Celumax[®] BC. For the three solvents tested, the chloroform allowed higher P(3HB) extraction showing that the polymer is more soluble in this compound. Of the nine enzymes evaluated, Celumax[®] BC was the one that caused higher disruption of the bacteria's cellular membrane. The results about optimization of the operational conditions of Celumax[®] BC showed that the enzyme is more stable in acetate buffer with pH 4,0 and bath at 60°C, the time of 1 h of hydrolysis and concentration of 0,02% (w/w) provided the disruption of the membrane of bacteria and high polymer extraction. The recovery of P(3HB) by enzymatic digestion was 94,5% and the film contained 91% of purity. The preliminary experiments in agitated flasks showed that *Cupriavidus necator* grows better (9,9 g.L⁻¹) in environment with 40 g.L⁻¹ of glucose, 2 g.L⁻¹ of urea and 15 mL.L⁻¹ of trace elements solution. For production of P(3HB), the experimental planning showed that, with 2 g.L⁻¹ of urea, 1,5 g.L⁻¹ of KH_2PO_4 and 0,6 g.L⁻¹ of Na_2HPO_4 the bacteria accumulated 70,4% of polymer. The results points that the use of enzymes to polymers extraction is an efficient process, showing that there is no need to use chemical components to assist in the disruption of the cells of *Cupriavidus necator*.

Keywords: *Cupriavidus necator*, poly(3-hydroxybutyrate), recovery, enzymes.

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento industrial da segunda metade do século XX foi profundamente marcado pelo surgimento dos materiais poliméricos e plásticos, os quais constituem atualmente boa parte dos materiais utilizados pelo homem.

Os plásticos têm papel fundamental na sociedade moderna, onde são utilizados de inúmeras formas, inclusive em algumas aplicações para as quais anteriormente eram utilizados outros materiais como metais, vidro, madeira e papel. Possuem, dessa forma, um grande mercado e também representam um mercado em crescimento. Entretanto, estes materiais têm despertado grande preocupação devido à sua rápida descartabilidade, como por exemplo, na aplicação em embalagens, e à sua grande dificuldade de degradação no meio ambiente (GOMEZ et al., 1997).

O aumento do interesse científico pela área ambiental, atraído pelo crescimento explosivo do consumo de plásticos e pela disposição final destes resíduos sólidos urbanos, têm tornado mais necessário a produção de substitutos ambientalmente sustentáveis (VINHAS et al., 2007). Cada vez mais estão sendo estudadas alternativas como a reciclagem de produtos constituídos de plásticos e a substituição por plásticos biodegradáveis que são compostos por um vasto grupo de materiais poliméricos, naturais e sintéticos, e sofrem alterações químicas e físicas sob a influência de fatores ambientais (SOTERO, 2000).

Os plásticos biodegradáveis, ou bioplásticos, são polímeros que se degradam completamente ao ataque microbiano em um curto período de tempo, sob condições apropriadas do meio ambiente. Existem no mercado diversos plásticos biodegradáveis tais como polihidroxialcanoatos (PHA's), polilactato (PLA) e poli(ϵ -prolactona) (PCL) (SERAFIM et al., 2002).

Polihidroxialcanoatos (PHA's) são poliésteres sintetizados por várias bactérias e armazenados na forma de inclusões citoplasmáticas como reserva energética e poder redutor, que podem representar até 80% da massa seca celular (CHOI e LEE, 1999a). O PHA mais estudado e bem caracterizado é o poli(3-hidroxiobutirato) (P(3HB)), que pode ser produzido pela bactéria Gram-negativa *Cupriavidus necator* a qual se destaca pela alta taxa de produção de polímero (RAMSAY et al., 1990a).

O uso de PHA's como substituto de plásticos derivados de petróleo depende da capacidade de se produzir poliésteres a custos competitivos (SIM et al., 1997). Para a implementação bem sucedida de sistemas de produção comercial de PHA, tem-se como pré-requisito a otimização de todos os aspectos das condições de cultivo e extração do polímero.

O elevado custo de produção de PHA's se deve, em grande parte, ao processo de extração do polímero. Desta forma, estudos têm sido realizados para tentar minimizar os custos de produção através da utilização de fontes de carbono de baixo custo, desenvolvimento de novas linhagens e técnicas mais eficientes para recuperação de polímeros (MARANGONI, 2000), além de uma melhor compreensão do metabolismo dos microrganismos produtores a fim de alcançar melhores valores de velocidade específica de produção, produtividade e a obtenção de melhores fatores de conversão de substrato em produto, através

do aperfeiçoamento dos sistemas de controle e desenvolvimento de novas técnicas de produção (BRAUNEGG et al., 1998).

A recuperação de P(3HB) consiste em uma etapa importante do processo de produção. O desenvolvimento de processos que utilizem solventes nos quais o polímero é mais solúvel torna-se necessário para uma produção de P(3HB) economicamente atrativa (REDDY et al., 2003).

O uso e produção de enzimas, em diferentes áreas da agroindústria de alimentos, mostram perspectivas futuras promissoras devido às várias características inerentes à ação das enzimas que são compostos naturais, biodegradáveis e capazes de desempenhar reações específicas sem produzirem produtos secundários (COURI, 1998).

A adição de enzimas na etapa de recuperação de P(3HB) é importante para hidrolisar proteínas já que este processo é reconhecido por modificar as propriedades físico-químicas e funcionais das proteínas das células de *Cupriavidus necator*.

Este trabalho teve como objetivo principal a utilização de enzimas na extração de polihidroxialcanoatos sintetizados por *Cupriavidus necator*.

E os objetivos específicos foram:

- Desenvolver técnicas que minimizem a utilização de solventes e enzimas;
- Otimizar as condições de operação das etapas de recuperação;
- Estudar a recuperação do polímero com o uso de diferentes tipos de enzimas e de solventes para extração do P(3HB);
- Verificar o efeito das variáveis: temperatura, pH, solvente e concentração de enzima, sobre a concentração de P(3HB) extraído;
- Analisar os custos com enzimas no processo de recuperação de P(3HB);
- Avaliar a capacidade de produção de P(3HB) por *Cupriavidus necator* em diferentes condições de cultura em frascos agitados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plásticos em geral

O avanço do preço internacional do barril de petróleo, a instabilidade da situação geopolítica das regiões detentoras das grandes reservas mundiais e o consenso mundial da necessidade do desenvolvimento de tecnologias de baixa emissão de gases de efeito estufa, como o CO₂, têm apontado para a possibilidade real da exploração de matérias-primas como fontes renováveis de insumo para a biossíntese de intermediários e de produtos químicos finais.

O crescimento populacional e econômico, na maioria dos países, tem como consequência um grande aumento na produção de lixo. Segundo dados do Diário Oficial do Estado de São Paulo (2007), cada família brasileira descarta cerca de 40 Kg de plásticos por ano, destes, 80% são usados apenas uma vez e descartados.

Os plásticos convencionais, produzidos a partir de derivados de petróleo, originam enormes problemas de contaminação ambiental por não serem biodegradáveis, persistindo como contaminantes durante longos períodos de tempo. Como a utilização de produtos plásticos cresce nos últimos anos, cada vez mais são realizadas pesquisas no sentido de desenvolver polímeros biodegradáveis com propriedades idênticas às dos plásticos convencionais, de modo a poderem substituir estes últimos em aplicações semelhantes (SERAFIM et al., 2002). A Figura 1 mostra o aumento na demanda de polímeros sintéticos para a produção da indústria de transformação de produtos plásticos selecionados nos últimos anos.

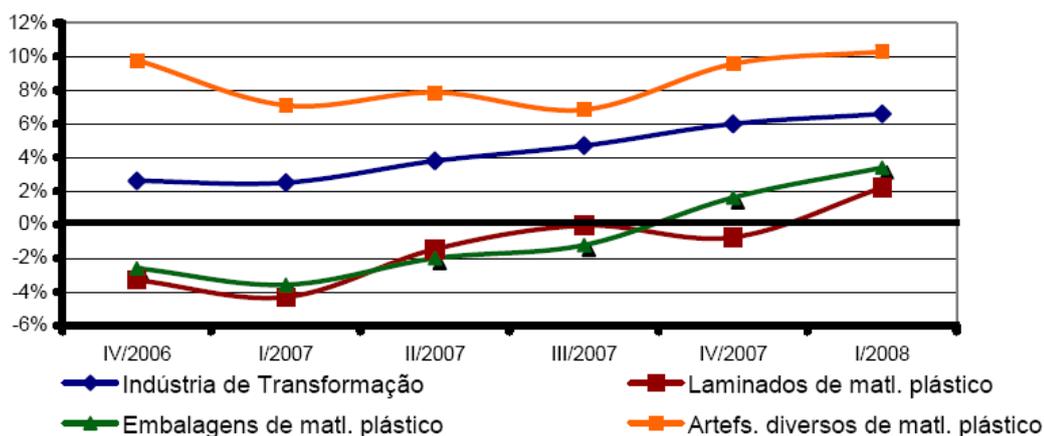


Figura 1 - Variação da produção física da indústria de transformação de produtos plásticos selecionados (taxa acumulada nos últimos trimestres – IV/2006 a I/2008). Fonte: HIRATUKA et al., 2008.

Os plásticos mais utilizados, desde 1940, têm sido polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), poli(tereftalato de etileno) (PET) e poli(cloreto de vinila) (PVC) que, apesar do avanço no processamento e fabricação, geram dois grandes problemas: o uso de fonte não-renovável para obtenção

de sua matéria-prima e a grande quantidade de resíduos gerada para descarte. A presença do plástico de origem petroquímica em aterros compromete a circulação de gases e líquidos, dificultando a degradação de outros materiais constituintes do lixo, retardando a estabilização das áreas dos aterros. Em áreas fluviais, contamina os rios, provoca enchentes e cria zonas mortas nos mares matando animais (SARTORI, 1998). Quando incinerados ou queimados, emitem várias substâncias tóxicas, que podem ter efeito carcinogênico, como as dioxinas (ROCHA, 2000).

Plásticos biodegradáveis são definidos como polímeros cuja degradação resulta primariamente da ação de microrganismos de ocorrência natural, entre eles, bactérias, fungos ou algas (ROSA et al., 2000). A procura e investimento nestes materiais têm aumentado cada vez mais. Bastos (2007) avaliou o impacto da biotecnologia na indústria química e constatou que em 2005 foram investidos US\$ 1 bilhão em polímeros contra US\$ 20 bilhões em combustíveis (etanol e biodiesel).

Os polímeros biodegradáveis mais estudados são: polihidroxialcanoatos (PHA's), ácido polilático (PLA) e poli(ϵ -prolactona) (PCL) (OLIVEIRA, 2006). A Figura 2 apresenta a classificação dos polímeros biodegradáveis.

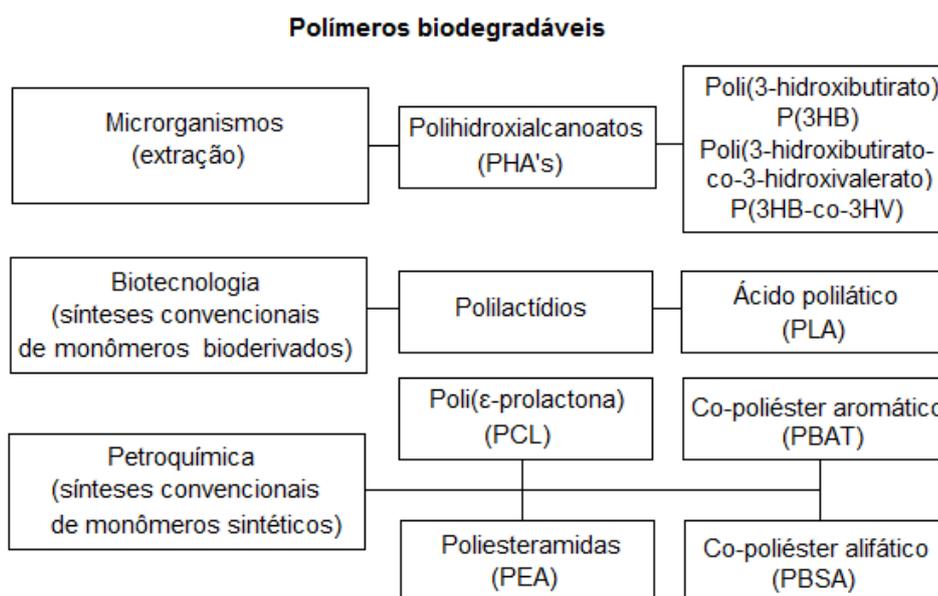


Figura 2 - Classificação de polímeros biodegradáveis. Fonte: AVÉORUS, 2004.

Dentre estes biopolímeros, os mais estudados são os polihidroxialcanoatos (PHA's) que podem ser produzidos a partir de recursos renováveis como açúcares e ácidos graxos, apresentando propriedades termoplásticas e características físicas e mecânicas semelhantes às do polipropileno, o que os torna possíveis candidatos progressivamente mais aplicáveis na sua substituição (SQUIO, 2003).

O PLA é um poliéster alifático produzido do ácido láctico por fermentação de açúcares seguida de purificação e polimerização (PRADELLA, 2006). Como este polímero apresenta estrutura quebradiça, muitos pesquisadores adicionam plastificantes a sua composição, tais como polietileno glicol (MARTIN e AVÉORUS, 2001). Embora constitua uma alternativa ambientalmente correta e tecnicamente competitiva

com os polímeros convencionais, o preço do PLA ainda supera muitos produtos petroquímicos, o que tem levado ao seu uso em blendas com amido (BASTOS, 2007).

PCL é um termoplástico sintético e biodegradável obtido através da polimerização de ϵ -caprolactona utilizando um catalisador como o octanato de estanho. Sua aplicação é muito investigada particularmente no contexto de sistemas de liberação de drogas (CHIELLINI e SOLARO, 1996). O tempo de degradação do PCL é muito curto (poucos dias), o que condiciona a sua utilização, portanto, este poliéster normalmente é misturado com amido, obtendo-se um material com biodegradabilidade adequada (OLIVEIRA, 2006).

O material plástico biodegradável tem uma ação degradante inferior, se comparado com o plástico comum, pois seu tempo de degradação é estimado em 18 meses, no máximo, enquanto que o plástico comum pode levar até 100 anos para se decompor (DIÁRIO OFICIAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2007), pois possui alta massa molar média e hidrofobicidade que dificultam a ação dos microrganismos e de suas enzimas na superfície do polímero (LEE et al., 1993).

2.2 Polihidroxialcanoatos (PHA's)

PHA's são poliésteres de reservas de carbono de energia produzidos por algumas bactérias quando a fonte de carbono é abundante, e outro nutriente, por exemplo, nitrogênio, fosfato ou oxigênio tornam-se limitantes. Quando a fonte de carbono é exaurida, o PHA é utilizado pela bactéria (KOLIBACHUK et al., 1999). Estes polímeros são acumulados na forma de grânulos intracelulares, que podem representar até 80% da massa seca celular (ANDERSON e DAWES, 1990).

A produção de PHA depende da natureza química da matéria prima oferecida como fonte de carbono à bactéria, bem como das vias metabólicas que esta possui. Em diversas etapas do metabolismo, a partir da fonte de carbono, a bactéria pode gerar intermediários na forma de hidroxiacil-CoA, os quais serão reconhecidos e polimerizados pela enzima PHA sintase, presente nas bactérias capazes de acumular estes materiais (SILVA et al., 2007).

Mais de 150 hidroxialcanoatos distintos já foram identificados como constituintes de PHA's sintetizados por organismos naturais ou recombinantes bacterianos (STEINBÜCHEL e VALENTIM, 1995). Por esta razão, o domínio sobre o processo de síntese pode permitir a produção de PHA sob medida para as aplicações que se desejar.

A Figura 3 mostra a fórmula geral dos PHA's onde n pode variar de 1 a 3. Quando o grupo R for igual a H, CH₃, CH₂CH₃, para n=1, os PHA são classificados como PHA'scl ("short chain length"), ou seja, compostos por monômeros de cadeia curta. Quando R = (CH₂)₂CH₃ a (CH₂)₈CH₃, os monômeros são considerados de cadeia média, constituindo os PHAmcl ("medium chain length") (COLLINS, 1987).

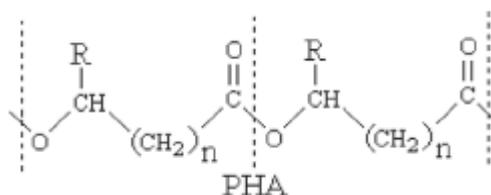


Figura 3 - Fórmula geral dos PHA's. Fonte: SILVA, et al., 2007.

A repetição das unidades na estrutura dos PHA's depende das espécies bacterianas e o comprimento da cadeia da fonte de carbono alimentada durante a síntese. Contudo, muitos dos precursores usados para crescimento celular e síntese do polímero podem conter uma ampla variedade de grupos funcionais que, quando inseridos à cadeia polimérica, geram um polímero quimicamente funcional, permitindo modificar as propriedades do material (FULLER, 1999).

Segundo Gomez et al. (1997), o primeiro polímero da família dos PHA a ser estudado foi o homopolímero poli(3-hidroxiбутирато) (P(3HB)), cujas propriedades termoplásticas foram logo em seguida modificadas pela produção do copolímero de poli(3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxiвалерато) (P(3HB-co-3HV)). Este copolímero possui propriedades mecânicas superiores às do homopolímero, sendo mais flexível, o que o torna mais atrativo para fins industriais.

2.2.1 Poli(3-hidroxiбутирато) (P(3HB))

O interesse na utilização do P(3HB) como um tipo alternativo de material plástico surgiu na década de 70, em decorrência do aumento do preço e da escassez do petróleo, não somente porque poderia ser sintetizado a partir de fontes renováveis, mas também devido à semelhança das suas propriedades com o polipropileno (BRAUNEGG et al., 1998).

O P(3HB) é um polímero termoplástico biodegradável produzido por microrganismos e que possui características similares aos plásticos convencionais. O material é constituído de poliésteres alifáticos, é solúvel em solventes orgânicos e insolúvel em água. O produto é acumulado no interior das células e sua extração é uma etapa crítica, elevando os custos de produção (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998).

Devido às propriedades físicas e químicas, o P(3HB) apresenta boa processabilidade em equipamentos comumente usados para processamento de poliolefinas e outros plásticos sintéticos, tornando-se adequado para moldagem por injeção, extrusão, indicando que PHA's podem ser adequados para aplicações em várias áreas como um substituto parcial dos plásticos sintéticos não biodegradáveis (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998). Contudo, o P(3HB-co-3HV) apresenta maior utilidade que o P(3HB) devido às suas propriedades termomecânicas. As unidades repetidas de 3HV na cadeia polimérica reduzem a dureza, a cristalinidade e o ponto de fusão do polímero, aumentando, dessa forma, a flexibilidade e elasticidade e, conseqüentemente, sua resistência ao impacto e melhorando sua processabilidade (BYROM, 1987).

A facilidade de purificação e preparo, sem a presença e contaminação por resíduos de metal que funcionam como catalisadores, caracteriza o P(3HB) como um potencial substituto de materiais como gelatina, proteínas e polímeros de ácido lático nos processos de microencapsulação (LU et al., 2001).

2.2.2 Características e propriedades do P(3HB)

As propriedades e características do P(3HB), em alguns aspectos, assemelham-se àquelas do polipropileno: termoplástico, biodegradável, pode ser produzido a partir de recursos renováveis, não tóxico, biocompatível, grau elevado de polimerização, insolúvel em água, altamente cristalino se extraído de seu ambiente natural, oticamente ativo e isostático (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998). A Tabela 1 compara as principais características do P(3HB) e do polipropileno.

Tabela 1 - Comparação entre as características do P(3HB) e do polipropileno (PP).

Características	P(3HB)	PP
Temperatura de fusão	180°C	174°C
Temperatura de transição vítrea	5°C	17°C
Densidade	1,18 - 1,25 g.cm ⁻³	0,91 g.cm ⁻³
Cristalinidade	70%	68%
Permeabilidade ao O ₂	45 cm ³ .m ⁻² .at ⁻¹ .dia ⁻¹	1700 cm ³ .m ⁻² .at ⁻¹ .dia ⁻¹
Módulo de elasticidade	3500 MPa	1700 MPa
Tensão de cisalhamento	40 MPa	38 MPa
Resistência à ruptura	5%	400%
Massa molecular	1 - 8.10 ⁵ g.mol ⁻¹	2,2 - 7.10 ⁵ g.mol ⁻¹

Fonte: GOMEZ e BUENO NETTO, 1997.

No estado sólido, o P(3HB) é uma hélice compacta orientada para a direita onde duas unidades monoméricas completam o giro da hélice. As forças básicas deste modelo conformacional são principalmente as interações de van der Waals entre o oxigênio das carbonilas e os grupos metila (NASCIMENTO, 2001). Devido à estereorregularidade do P(3HB), o material é altamente cristalino (70%) e relativamente frágil (LEE, 1996a). Apresenta uma temperatura de cristalização em torno de 5°C e baixa estabilidade frente à fusão, pois se decompõe em aproximadamente 200°C, ou seja, numa temperatura próxima a temperatura de fusão (180°C) (CARMIGNAN et al., 2008).

Uma combinação de alta cristalinidade e altas temperaturas faz com que os seus filmes sejam bastante brilhantes. Sua rigidez e baixa resistência ao impacto têm dificultado bastante sua utilização. Copolímeros de PHB possuem melhores propriedades mecânicas (CHANDRA e RUSTIGI, 1998) e devido a isso, a incorporação de unidades 3-hidroxicaprolato (3HV) vem sendo muito explorada, tornando o copolímero P(3HB-co-3HV) mais flexível e com maior resistência à ruptura. À medida que aumenta a fração 3HV, ocorre o decréscimo da temperatura de fusão, sem afetar a temperatura de degradação,

permitindo melhor processamento térmico do copolímero, o que o torna mais atrativo para produção industrial (LEE, 1996a).

A tensão de cisalhamento do P(3HB) é similar à do PP, porém, sua resistência à ruptura (5%) é muito menor do que a do polímero derivado do petróleo (400%).

A alta massa molecular do P(3HB), que pode chegar a $8.10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, é desejável para aplicações industriais. Segundo Agus et al. (2006) o polímero com alta massa molecular é um material muito útil para a preparação de filmes e fibras fortes por extração quente ou fria.

Bourque et al. (1995) observou que a massa molecular dos PHA's pode ser reduzida durante o processamento dos polímeros. Em adição, Lafferty et al. (1988) afirmou que esta diminuição ocorre também durante o processo de extração da biomassa.

A resistência à água, à radiação ultravioleta e a impermeabilidade ao oxigênio tornam o P(3HB) adequado para ser usado na confecção de embalagens alimentícias (GROTHER et al., 1999).

2.3 Organismos produtores de polihidroxialcanoatos

São conhecidos mais de 300 microrganismos capazes de sintetizar PHA's, mas somente poucas bactérias são efetivamente empregadas na sua produção, incluindo *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, vários isolados de metilotrofos, *Pseudomonas oleovorans* e, recentemente, as versões recombinantes de *Cupriavidus necator* e *Escherichia coli*. Estas bactérias foram selecionadas principalmente porque podem ser eficientemente cultivadas com alta densidade celular, acumulando alta concentração de PHA em um período relativamente curto de tempo, resultando em alta produtividade que é um fator indispensável para que se consiga diminuir os custos de produção dos polímeros biodegradáveis (LEE, 1996b).

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

2.3.1 *Cupriavidus necator*

É o microrganismo mais atraente para a produção industrial por acumular mais de 80% de sua massa celular em P(3HB) com alta massa molar e utilizando diferentes tipos de substratos (BYROM, 1987) como a glicose ou a frutose (espécie mutante), formiato, acetato, propionato, lactato, glutamato, succinato,

fenobenzoato (TANAKA et al., 1994), soro de leite fermentado e açúcares invertidos de cana-de-açúcar (RAMSAY et al., 1990a), podendo ainda utilizar outras fontes como etanol, ácido oléico e até mesmo dióxido de carbono (LEE, 1996b).

Quando o ácido propiônico é adicionado ao meio, a bactéria sintetiza o copolímero contendo monômeros 3HB e 3HV. A proporção de unidades 3HV depende da razão de alimentação ácido propiônico/açúcar, durante a fase de acúmulo. *C. necator* também é capaz de acumular polímero contendo monômeros 4HB e 5HV, dependendo do substrato utilizado (ANDERSON e DAWES, 1990).

2.3.2 *Alcaligenes latus*

Alcaligenes latus pode utilizar sacarose e melão de cana-de-açúcar como fonte de carbono e acumula PHA durante a fase de crescimento com velocidade específica elevada (LEE, 1996b). Yamane et al. (1996) obtiveram menos de 50% de polímero em biomassa em condições não limitantes enquanto que Wang e Lee (1997) alcançaram um conteúdo de P(3HB) em biomassa seca de 88% sob limitação de nitrogênio.

A desvantagem do uso deste microrganismo é a sua sensibilidade aos precursores utilizados para a produção do copolímero P(3HB-co-3HV), ou seja, o crescimento de *A. latus* é completamente inibido em presença de ácido propiônico na concentração de 0,5 g.L⁻¹ (BRAUNEGG et al., 1998).

2.3.3 *Azotobacter vinelandii*

Esta bactéria acumula P(3HB) em culturas de batelada alimentada durante a fase de crescimento, tendo glicose como fonte de carbono. Segundo Lee (1996b), em 47 h de cultivo, *A. vinelandii* pode produzir uma concentração de P(3HB) de 32 g.L⁻¹ utilizando-se peptona de peixe como suplemento.

Este microrganismo é capaz de produzir polímero eficientemente a partir de melão de beterraba, reduzindo o custo de produção com relação ao substrato. Entretanto, o uso deste melão pode incrementar os gastos com o tratamento de resíduos da fermentação (PAGE e CORNISH, 1993). A utilização de *A. vinelandii* na produção de biopolímero foi rejeitada por produzir paralelamente um polissacarídeo, tornando o processo de difícil controle (BYROM, 1987).

2.3.4 Organismos metilotróficos

São microrganismos que utilizam metanol como fonte de carbono, um substrato de interesse por ter baixo custo e propriedades favoráveis ao processo como miscibilidade em água, fácil manuseio e baixa viscosidade. Entretanto, o processo de produção é lento, com baixa produtividade e o polímero sintetizado apresenta baixo peso molecular, em quantidades pequenas e de difícil extração (SQUIO, 2003).

Alguns microrganismos pesquisados são *Methylobacterium extorquens* e *Methylobacterium organophilum*. O conteúdo de polímeros geralmente obtido por metilotróficos é de aproximadamente 50 - 60% do peso seco da célula, o que torna necessário o desenvolvimento de novas técnicas para aumentar o teor de PHA intracelular (LEE, 1996b).

2.3.5 Bactéria do gênero *Pseudomonas*

Apesar de *P. oleovorans* não ser capaz de utilizar glicose e outros açúcares para acumular PHA's, outras pseudomonas como *P. putida* e *P. aeruginosa* o fazem. Os PHA's, formados de gluconato e outros açúcares, têm composição diferente dos formados a partir de ácidos graxos, prevalecendo nos primeiros o 3-hidroxidecanoato e pequenas parcelas de monômeros insaturados, enquanto que nos últimos, prevalece como maior constituinte o 3-hidroxioctanoato (TIM e STEINBÜCHEL, 1990).

Anderson e Dawes (1990) relataram que PHA's de cadeia média (MCL) de C6 a C14, podem ser sintetizados por *Pseudomonas oleovorans* quando cultivado em alcanosatos, álcoois, alcanóis, alcanos ou alenos como fontes do carbono, onde o tipo e a composição dos monômeros variam dependendo do substrato empregado.

2.3.6 Bactérias do gênero *Burkholderia*

O gênero *Burkholderia* vem sendo pesquisado para produção de plásticos biodegradáveis. Este microrganismo foi isolado do solo e é capaz de acumular PHA's contendo unidades 3HB e 3HB-4-ácido pentenóico (3HPE), a partir de fontes simples de carbono como sacarose ou gluconato (ANDRADE RODRIGUES et al., 2000).

Uma das linhagens isoladas, a *Burkholderia sacchari* IPT 101 apresenta boa produção do copolímero P(3HB-co-3HV). Entretanto, assim como a maioria dos microrganismos produtores de PHA's, tem baixa conversão de ácido propiônico em unidades 3HV (GOMEZ et al., 1997). Com o intuito de aumentar a eficiência de conversão e utilização do ácido propiônico, Silva et al. (2000) desenvolveram mutantes da *Burkholderia* sp. IPT 101 incapazes de crescer em ácido propiônico, porém ainda capazes de acumular unidades 3HV a partir do ácido.

2.3.7 *Escherichia coli*

Após a clonagem dos genes da biossíntese de PHA de *Cupriavidus necator* em *Escherichia coli*, *E. coli* recombinante tem sido investigada para a produção de P(3HB) porque tem diversas vantagens sobre outras bactérias, sendo capaz de acumular mais de 80% de sua massa seca em polímero (ASTAR e GRUYS, 2002).

Altas concentrações são possíveis com elevada produtividade em cultivo por batelada alimentada. Outra vantagem é o fato de a *E. coli* ser capaz de utilizar várias fontes de carbono incluindo sacarose, lactose e xilose, permitindo a produção de P(3HB) com subprodutos de baixo custo da agricultura como melaço, soro de queijo e hidrolisado de hemicelulose (CHOI e LEE, 1999a). Entretanto, a *E. coli* não utiliza eficientemente ácido propiônico, impossibilitando a produção do P(3HB-co-3HV) (LEE, 1996b).

2.3.8 Produtores transgênicos

2.3.8.1 Insetos

O gene *phaC* de *C. necator* foi expresso pela primeira vez em insetos na espécie *Trichoplusia ni*, por um sistema de infecção bacterioplasmidial. A expressão foi tida como um sucesso, uma vez que após 60 h, 50% do total de proteína era P(3HB) polimerase. Em contraste a outros sistemas recombinantes, a expressão do gene *phaC* em insetos permite uma rápida purificação da forma solúvel da P(3HB) polimerase (WILLIAMS et al., 1996).

2.3.8.2 Plantas

É conhecido o uso da planta *Arabidopsis thaliana* ancorando genes de biossíntese de PHA de *C. necator*. Porier et al. (1992) obtiveram sucesso na expressão dos genes relacionados com a aceto-acetil-CoA redutase e PHA sintase no citoplasma de *A. thaliana* que resultou na síntese de P(3HB) no citoplasma, núcleo e vacúolos de todo o tecido da planta, mas em pequenas quantidades e com um crescimento retardado do vegetal (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998).

2.4 Descrição geral de *Cupriavidus necator*

Inicialmente foi classificada como *Alcaligenes eutrophus*, mais tarde como *Rashtonia eutropha* e atualmente como *Cupriavidus necator*, como será tratada em todo o trabalho. É um microrganismo procariótico, do tipo Gram-negativo encontrado naturalmente no solo e na água.

A parede celular das bactérias Gram-negativas é formada pelo peptoglicano, que constitui uma camada basal delgada, sobre a qual se encontra outra camada, composta por lipoproteínas, fosfolípidios, proteínas e lipopolissacarídeos, denominada membrana externa (NEIDHART et al., 1990). A Figura 4 ilustra a parede celular de microrganismos Gram-negativos.

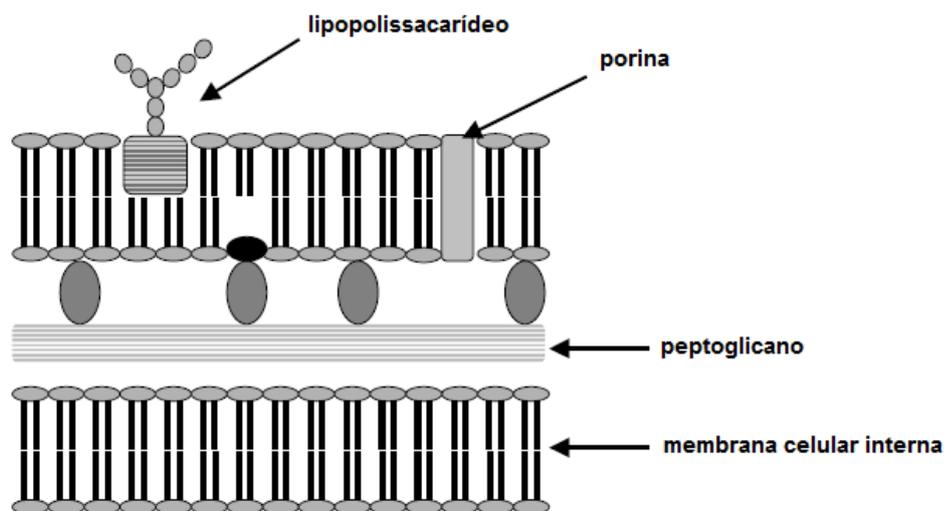


Figura 4 - Parede celular de microrganismos Gram-negativos. Fonte: HEE, 2006.

Cupriavidus necator possui células na forma de bastonetes com dimensões de 0,5 por 1,8 a 2,6 μm , é móvel, possuindo de 1 a 4 flagelos peritríquios. As células podem se tornar esféricas na fase estacionária de crescimento (MARANGONI, 2000).

Segundo Tanaka et al. (1994), o pH ótimo para o crescimento e sintetização de P(3HB) por *C. necator* encontra-se em torno de 6,9. Em meios mais ácidos a produtividade diminui e em pH de 5,4 há inibição do crescimento. O P(3HB) é acumulado nas células na forma de grânulos discretos, sendo que Lee (1996a) observou a quantidade de 8 a 13 grânulos por célula, com diâmetro de 0,2 a 0,5 μm . A Figura 5 mostra células de *Cupriavidus necator* compostas por grânulos de P(3HB) após a fase de produção.

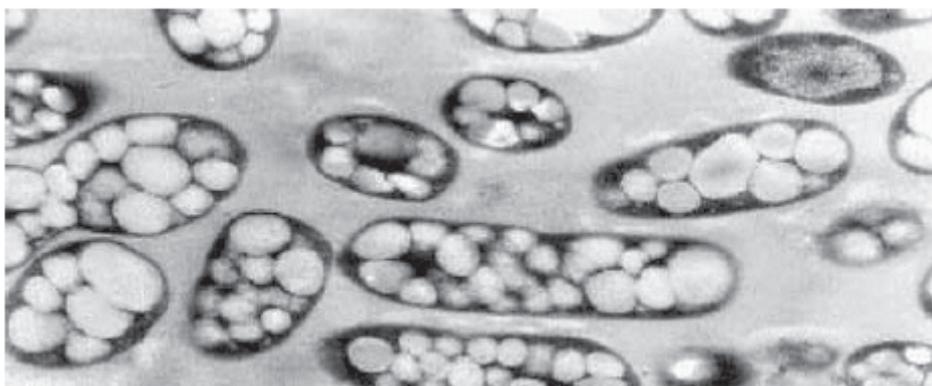


Figura 5 - Grânulos de P(3HB) no interior das células de *Cupriavidus necator*.

Fonte: BRAUNEGG et al., 1998.

Cupriavidus necator é capaz de crescer em condições de quimiolitotrofia ou heterotrofia. A quimiolitotrofia é a capacidade dos microrganismos utilizarem os compostos inorgânicos como doadores de elétrons e o dióxido de carbono como fonte de carbono, enquanto a heterotrofia é a capacidade de utilizar compostos orgânicos como fonte de carbono e energia (DOELLE, 1975). Também pode crescer autotroficamente em atmosfera de gases como H_2 , O_2 e CO_2 (TANAKA et al., 1994).

Muitos são os microrganismos produtores de PHA's, sendo que a espécie *Cupriavidus necator* é uma das que apresenta condições mais favoráveis à produção industrial, destacando-se por obter alta taxa de produção de polímero (RAMSAY et al., 1990a). Para alcançar alta produtividade de P(3HB), geralmente *C. necator* é cultivado em sistema de batelada alimentada com monitoramento de pH e oxigênio dissolvido (KIM et al., 1999).

2.5 Biossíntese de P(3HB) por *Cupriavidus necator*

Os genes envolvidos na biossíntese de PHA's de várias bactérias foram clonados e analisados ao nível molecular (STEINBÜCHEL, et al. 1992) sendo que os genes melhor estudados e caracterizados são os envolvidos na biossíntese do P(3HB) pela bactéria *Cupriavidus necator* (PEOPLES e SINSKEY, 1989).

Em cultivos que proporcionam um crescimento balanceado, *C. necator* cataboliza os carboidratos pela via Entner-Doudoroff a piruvato, que pode então ser convertido através de desidrogenação a acetil-CoA (BRAUNEGG et al., 1998), seguindo para a via de produção de PHA, gerando tanto homopolímeros P(3HB) quanto heteropolímeros P(3HB-co-3HV) que são sintetizados unicamente na presença de substratos como propionato e valerato. Estas fontes de carbono são degradadas a propionil-CoA ou 3-hidroxicinovelil-CoA e devem ser utilizadas na presença de outros substratos como frutose e glicose (STEINBÜCHEL e PIEPER, 1992).

Dawes (1985) afirmou que os microrganismos sintetizam polímeros quando a fonte de carbono é suficiente sob condições de limitação. *C. necator* sintetiza o P(3HB) a partir de três reações sequenciais catalisadas por enzimas (DAWES e SENIOR, 1973). A primeira enzima na via de biossíntese de P(3HB), a β -cetotiolase, compete por acetil-CoA com várias outras vias metabólicas incluindo síntese de ácidos graxos e formação de acetato e citrato. Essa enzima é inibida por moléculas de CoASH livres. Acetoacetil-CoA redutase, a segunda enzima na via de síntese de P(3HB), requer NADPH como cofator. Então, a atividade de acetoacetil-CoA redutase, bem como a quantidade e a razão de nicotinamida nucleotídeo, oxidada e reduzida, parece ser importante na regulação da síntese de P(3HB). Citrato sintase, a primeira enzima no ciclo dos ácidos tricarbóxicos, não somente compete com β -cetotiolase por acetil-CoA mas também libera moléculas de CoA livres, o que afeta negativamente a síntese de P(3HB) (LEE et al., 1995).

Sob condições balanceadas de crescimento, os níveis de CoASH são elevados. Em limitação de nutrientes essenciais ao crescimento como nitrogênio, fósforo ou oxigênio, mas em excesso de carbono, a formação de NADH inibe a citrato sintase, e os níveis de acetil-CoA sobem ao ponto em que a inibição pela CoASH é superada. A reação de condensação a acetoacetil-CoA é possível e P(3HB) é sintetizado. A degradação do polímero é controlada através da oxidação de monômeros de 3-hidroxicinovelilato pela enzima 3-hidroxicinovelilato desidrogenase. Esta enzima está sujeita a inibição pelo acetato e NADH (BYROM, 1987).

Os passos envolvidos na biossíntese de P(3HB), descritos acima, são mostrados na Figura 6.

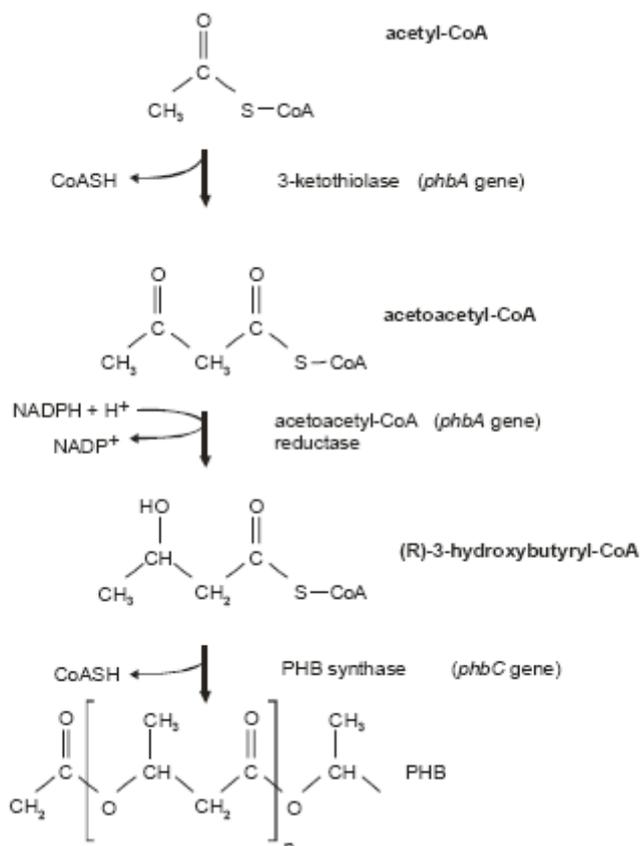


Figura 6 - Rotas metabólicas envolvidas na síntese de P(3HB) sob condição de crescimento balanceado e de excesso de carbono. Fonte: SOMERVILLE et al., 1997.

A síntese de P(3HB) não funciona apenas como reserva de carbono e energia, mas também para a diminuição do poder redutor, podendo ser considerado como regulador do poder de óxido-redução da célula (SENIOR e DAWES, 1971).

Dawes e Senior (1973) observaram que a síntese de P(3HB) foi acompanhada por um pronunciado aumento no poder redutor da cultura com concomitante queda nas taxas de utilização de oxigênio e evolução do gás carbônico, concluindo que durante a limitação de oxigênio, as células ajustam-se ao novo meio pela reoxidação do poder redutor através da síntese de P(3HB).

2.6 Biodegradação

Uma importante característica dos PHA's, atrativa comercialmente, é sua biodegradabilidade. Durante a degradação não há produção de intermediários nocivos (LUZIER, 1992), este processo ocorre através da colonização da superfície do PHA por uma bactéria ou fungo, que secreta uma despolimerase extracelular degradando o polímero em unidades monoméricas primárias nas proximidades da célula. Os produtos da degradação são absorvidos através da parede celular e metabolizados. (ASTAR e GRUYS, 2002).

A velocidade de biodegradação de PHA's depende de muitos fatores, alguns relacionados ao ambiente, como temperatura, umidade, pH e suprimento de nutrientes e outros relacionados ao próprio PHA, como composição, cristalinidade, aditivos e área superficial (SUDESH et al., 2000).

A Figura 7 representa o biociclo de produção e degradação de PHA's. Através da fotossíntese, as plantas utilizam a luz solar, CO_2 e água para produzir carboidratos os quais são utilizados como substrato em bioprocessos industriais, para produção de PHA's que serão purificados e processados formando os mais diversos artigos plásticos. Após o uso, estas embalagens podem ser depositadas em ambientes microbianos ativos e sua biodegradação formará CO_2 e água.

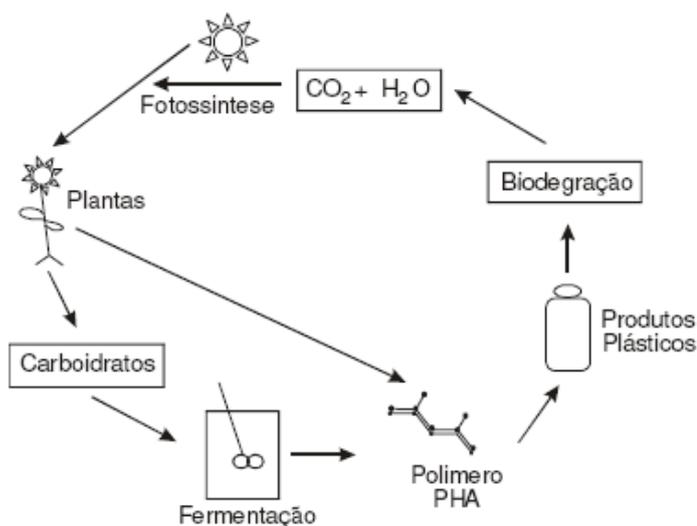


Figura 7- Biociclo de produção e degradação de PHA's.

Fonte: PHB INDUSTRIAL S. A., 2008.

O P(3HB) é um dos polihidroxicarboxilatos mais conhecidos e é degradado por inúmeros microorganismos em vários ecossistemas (KIM et al., 2000). Segundo Savenkova et al. (2000), 325 microorganismos que degradam o P(3HB) *in vitro* foram isolados dos solos sendo 154 bactérias, 77 estreptomicetos e 94 fungos. A maior perda de massa do biopolímero foi registrada na presença de um maior número de fungos (compostagem, turfa e despejos municipais), mostrando a importância dos fungos na degradação dos bioplásticos. A biodegradação de P(3HB) e seus copolímeros tem sido estudada em ambientes como solos, lodo ativado e água do mar (CHANDRA e RUSTIGI, 1998).

Rosa et al. (2002) avaliaram a biodegradação dos polímeros poli(β -hidroxibutirato) (PHB), poli(β -hidroxibutirato-co-valerato) (PHB-V) e poli-(ϵ -caprolactona) (PCL) em solo compostado, utilizando a técnica de biodegradação aeróbia e observaram que o PHB degradou mais rápido que os dois outros polímeros, com velocidade de degradação de $2,72 \text{ g.dia}^{-1}$, devido à sua estrutura química que pode ser atacada mais facilmente pelos microorganismos presentes no solo.

2.7 Aplicações

A primeira utilização de polihidroxialcanoatos foi em embalagens biodegradáveis para xampu obtidas pelo processo de injeção-sopro pela WELLA AG – Alemanha (NASCIMENTO, 2001).

Os PHA's podem ser utilizados para a produção de garrafas, fibras para embalagens biodegradáveis e como filmes envoltórios os quais podem ser aplicados em papelão para formar película impermeável e produzir um material composto completamente biodegradável, o que é uma alternativa aos materiais compostos não biodegradáveis preparados a partir de, por exemplo, papelão mais polietileno ou alumínio (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998).

Por serem biomateriais, os PHA's podem ser usados de forma direta, como suplemento, ou de modo a substituir as funções dos tecidos vivos do corpo humano, uma vez determinada a sua biocompatibilidade com o hospedeiro. Combinados a outros biomateriais podem ser utilizados em enxerto de ossos para preencher os defeitos ou substituir os ossos fraturados (RAMAKRISHNA et al., 2001).

Segundo Steinbüchel e Füchtenbusch (1998), estes biopolímeros podem ser aplicados como matriz em materiais retardantes para a liberação controlada de drogas, hormônios, herbicidas, inseticidas, flavorizantes e fragrâncias na medicina, agricultura, indústria farmacêutica e indústria de alimentos. Carmignan et al. (2008) avaliaram a liberação de produtos fármacos a partir de microesferas de PHA's e o estudo demonstrou o grande potencial de utilização dos polímeros na elaboração destes sistemas tanto para a via oral como parenteral, já que a liberação através das microesferas foi rápida.

Os polihidroxialcanoatos apresentam ainda potencial para aplicações terapêuticas. Polímeros contendo monômeros na forma 4-hidroxitirato, P(4HB), são empregados na forma de sais de sódio como anestésico (SUDESH et al., 2000).

2.8 Fatores que afetam o custo de produção

Apesar da ampla possibilidade de aplicação dos polihidroxialcanoatos, como visto anteriormente, os altos custos e as dificuldades de processamento são problemas que tornam inviável a comercialização destes materiais quando comparados aos plásticos de origem petroquímica. O grande obstáculo à substituição do polipropileno por PHA's tem sido de natureza econômica. De fato, o quilo do polipropileno custa em torno de US\$ 1,7 (ICIS, 2008) enquanto que o quilo do P(3HB), segundo dados cedidos pelo fornecedor, é de US\$ 4,5 (PHB INDUSTRIAL S. A., 2008).

A aplicação comercial de P(3HB) é limitada pelo custo com o substrato, já que este é o fator que contribui mais significativamente com os gastos na produção do polímero. Choi e Lee (1999b) realizaram uma avaliação econômica do processo de obtenção de P(3HB) a qual indicou que o custo com o substrato pode representar mais de 38% do custo total da produção deste bioplástico.

A redução dos custos de produção depende da obtenção de linhagens altamente eficientes na conversão dos substratos no produto desejado, da utilização de substratos de baixo custo, do

desenvolvimento de processos que permitam explorar ao máximo o potencial dessas linhagens e do desenvolvimento de processos de extração-purificação mais econômicos e eficientes (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997).

Quando o P(3HB) é produzido a partir de culturas de alta densidade celular, o oxigênio dissolvido pode atuar como fator limitante. O fornecimento de oxigênio suficiente para manter condições aeróbicas durante o cultivo torna a produção de biopolímeros onerosa (van WEGEN et al., 1998), principalmente em processos industriais de larga escala.

2.8.1 Substratos de baixo custo

Devido ao baixo custo, resíduos derivados de indústrias processadoras de alimentos como óleos vegetais, hidrolisados de amido (milho e mandioca), soro de leite, bagaço de maçã, melão (beterraba, cana-de-açúcar e cítrico), celulose e hemicelulose são substratos atrativos para a produção de PHA's. Várias bactérias podem produzir P(3HB) a partir de substratos compostos por resíduos industriais, entretanto, o conteúdo de polímero e a produtividade são menores do que as obtidas em culturas com fonte de carbono purificado (KIM e CHANG, 1998).

Em relação às matérias-primas disponíveis no Brasil, a cana-de-açúcar possui uma vantagem competitiva em face de seu custo de produção ser inferior do que em outros países. Além do aproveitamento de bagaço e palha para geração de energia, o melão pode ser utilizado na produção de biopolímeros. Beaulieu et al. (1995) estudaram a produção de P(3HB) por *Cupriavidus necator* DSM 545 em meios contendo 3% de glicose e diferentes concentrações de melão de cana-de-açúcar. Os autores concluíram que a suplementação com 0,3% de melão levou ao maior crescimento celular e maximizou a produção de polímero.

A xilose é um componente da hemicelulose, encontrada em resíduos vegetais como o bagaço de cana-de-açúcar. Lee (1998) utilizou uma linhagem de *E. coli* recombinante que abriga os genes de biossíntese de P(3HB) de *C. necator* para a produção do polímero a partir de xilose. Em meio suplementado com 20 g.L⁻¹ de xilose, o conteúdo de P(3HB) nas células foi de 35,8%. No cultivo com adição de xilose e hidrolisado de soja, a concentração aumentou para 73,9%.

Wong e Lee (1998) cultivaram *E. coli* recombinante, para a produção de P(3HB), em meio contendo solução concentrada de soro de leite e obtiveram um conteúdo de polímero de 80% com concentrações de células secas e P(3HB) de 87 g.L⁻¹ e 69 g.L⁻¹, respectivamente.

Resíduos amiláceos e óleos vegetais são muito estudados na produção de P(3HB) por serem compostos orgânicos de fonte renovável e de baixo custo. Dalcanton (2006) avaliou a síntese de P(3HB) por *C. necator* utilizando resíduo amiláceo com fonte de carbono em cultivos com e sem suplementação com óleo de soja em diferentes temperaturas de cultivo. O melhor resultado foi obtido em cultura suplementada a 35°C onde o acúmulo de P(3HB) foi de 5,0 g.L⁻¹. Sem suplemento nutricional, a concentração de polímero foi de 4,3 g.L⁻¹.

Fukui e Doi (1998) estudaram a capacidade de produção de PHA's por *C. necator* H16 e um mutante contendo a PHA sintase de *Aeromonas caviae* através do uso de óleos vegetais como óleo de oliva, milho e palma como únicas fontes de carbono. Os cultivos foram realizados em meio mineral acrescido de 1% do respectivo óleo vegetal, durante 72 h. Os resultados foram similares para os diferentes óleos, sendo obtida uma massa celular seca média de 4,0 g.L⁻¹ quando utilizada *C. necator* e 3,5 g.L⁻¹ para o mutante. A média de PHA acumulado foi de 80 e 78% para as duas espécies, respectivamente.

O melão cítrico é obtido a partir da concentração do licor resultante dos processos de moagem e prensagem dos resíduos de frutas cítricas após a extração do suco. Ienczak (2006) utilizou melão cítrico, de uma indústria processadora de suco de laranja, como substrato para a produção de P(3HB) por *C. necator*. Ao final do cultivo, a biomassa foi de 17,1 g.L⁻¹ com uma porcentagem de P(3HB) de 81%. O autor conclui que, devido ao seu baixo custo, o melão cítrico é uma boa alternativa para a produção de biopolímeros.

2.8.2 Técnicas de extração e recuperação de PHA's

Além de minimizar gastos de produção através da utilização de fontes de carbono de baixo custo, é importante também o desenvolvimento de técnicas mais eficientes e econômicas para recuperação de polímeros. A produção de PHA's integrada às indústrias sucroalcooleiras, além de empregar os insumos energéticos (energia e vapor) e melão da cana-de-açúcar no processo de fermentação, utiliza o solvente fabricado na própria usina no sistema de extração, permitindo um grande ganho competitivo.

Geralmente, a biomassa bacteriana é separada do meio de cultivo por centrifugação, filtração ou floculação e tratando-se do processo de recuperação de PHA's, são descritos vários métodos que incluem extração com solventes, digestão com hipoclorito de sódio e digestão enzimática (PUNRATTANASIN, 2001).

O método mais utilizado para a extração de polímeros é através de solventes orgânicos como clorofórmio, carbonato de propileno e dicloroetano. De acordo com Lee (1996), aproximadamente 20 partes de solvente devem ser empregadas para solubilizar uma parte de polímero.

Rossel et al. (2002) utilizaram álcoois de cadeia superior a três carbonos e os acetatos destes derivados para solubilizar a quente o P(3HB). No processo avaliado, o P(3HB) foi separado do solvente por decantação, flotação, filtração ou centrifugação sendo então lavado com vapor ou água próxima à temperatura de ebulição para remover o solvente residual. Numa técnica de recuperação, desenvolvida por Dalcaton (2006), o P(3HB) é extraído das células por um método físico, seguido de solubilização em clorofórmio. Após esta etapa, o solvente é evaporado para obtenção do biofilme de P(3HB).

Marchessault e Terada (1999) estudaram a solubilidade de polímeros polares como P(3HB) em diferentes solventes através de três parâmetros de solubilidade que são baseados nas forças entre unidades estruturais, interações entre grupos polares e pontes de hidrogênio. Os 38 diferentes solventes mencionados na literatura para extração de P(3HB) foram examinados por este método para comparação com dados teóricos de experimentos. Os solventes que apresentaram melhores parâmetros para extração de polímero

foram: clorofórmio, cloreto de metileno, 1,2-dicloroetano, etilacetato, 2,2,2-trifluoroetanol, 1,1,2,2-tetracloroetano e tricloroetileno.

Em um processo de recuperação de P(3HB) sintetizado por *C. necator*, Hahn et al. (1994) utilizaram uma dispersão de hipoclorito de sódio e clorofórmio, alcançando uma recuperação de 91% de polímero com 97% de pureza. A solução utilizada apresentava 30% de hipoclorito de sódio e o tempo de tratamento foi de 1,5 h. Entretanto, tal produto causa severa degradação do material, resultando em polímero de baixa massa molar e conseqüentemente na perda de suas propriedades, trazendo ainda o problema da dificuldade de eliminação completa de traços de hipoclorito do polímero, além de gerar efluentes contendo cloro (BERGER et al., 1989). De acordo com Ramsay et al. (1990b), a realização de pré-tratamento com surfactante seguido de digestão com hipoclorito sob condições otimizadas resulta em PHA mais puro e com menos degradação.

Choi e Lee (1999a) desenvolveram métodos de recuperação de P(3HB) sintetizado por *E. coli* recombinante envolvendo surfactantes, digestão alcalina (NaOH e KOH) e digestão ácida (HCl e H₂SO₄). Os melhores resultados foram obtidos quando as células contendo 77% de P(3HB) foram tratadas com solução de NaOH 0,2 N a 30°C durante 1 h. Neste ensaio, o polímero foi recuperado com 98,5% de pureza e, segundo os autores, este método reduziu em 25% o custo de produção de P(3HB) quando comparado ao método de digestão com surfactante e hipoclorito.

Fluidos supercríticos têm propriedades físico-químicas únicas tais como alta densidade e baixa viscosidade que os tornam eficientes como os solventes em processos de extração (JACQUEL et al., 2008). Um método de recuperação de P(3HB) sintetizado por *C. necator* proposto por Hejazi et al. (2003) utiliza a extração supercrítica com CO₂. O efeito dos diferentes parâmetros como tempo de exposição, pressão, temperatura e volume de metanol (modificador) foram investigados através de análise estatística para a obtenção de condições ótimas. As melhores condições para o rompimento celular e recuperação de P(3HB), que alcançou 89%, foram: 100 min de exposição, 200 atm, 40°C e 0,2 mL de metanol.

Os surfactantes se incorporam à membrana lipídica, rompendo a parede celular (JACQUEL et al., 2008) de bactérias como *Cupriavidus necator* auxiliando na extração de P(3HB). O uso do surfactante carnitina palmitoil, naturalmente encontrado em membranas celulares, foi investigada por Lee et al. (1993) para a lise de células de *C. necator*. A lise da parede celular da bactéria excedeu 70% com uma concentração ótima de surfactante de 0,1 M em meio Tris-HCl com pH 7,0 a 30°C durante 60 min. Os resultados mostraram que a carnitina palmitoil é mais eficiente do que lisozimas durante o rompimento das células sem degradar os grânulos dos PHA's.

Os dados apresentados mostram que a investigação de novas técnicas de extração é realizada a fim de conduzir uma ótima recuperação de P(3HB), com um elevado grau de pureza e baixo custo de produção.

2.8.2.1 Uso de enzimas na extração de poli(3-hidroxibutirato)

São conhecidos diversos processos de recuperação de PHA's. Porém o desenvolvimento de métodos eficientes, que podem ser diferentes para cada microrganismo empregado, é importante para o custo total da produção dos polímeros (CHOI e LEE, 1999a).

A digestão enzimática permite a obtenção de filmes de P(3HB) com maior grau de pureza porque facilita a remoção de materiais celulares devido ao tratamento térmico que auxilia na lise das células e na desnaturação dos ácidos nucleicos

O método de recuperação de PHA's utilizando digestão enzimática tem a vantagem de ser um processo seletivo e eficiente em termos energéticos, além de oferecer menor risco de danos ao produto quando comparado com outras metodologias (ASENJO e SUK, 1986).

As enzimas são catalisadores orgânicos, produzidos pelas células vivas, que governam as reações químicas nos processos vitais. Uma vez elaborada pelo organismo, uma enzima poderá atuar independentemente da célula, se condições apropriadas forem mantidas (BORZANI et al., 1975).

Segundo a Novozymes (1995) o uso de enzimas ao invés de produtos químicos apresenta algumas vantagens como: aceleram processos químicos sem que haja consumo das mesmas; são específicas, pois permitem a obtenção de altos rendimentos sem que haja formação de subprodutos indesejáveis; são eficientes já que uma reação catalisada por enzimas pode se processar de 10^6 a 10^{15} vezes mais rapidamente do que a mesma reação não catalisada; provém de sistemas naturais, portanto são ambientalmente sustentáveis e atuam em condições de fácil controle como pH e temperatura.

O isolamento de PHA's por digestão enzimática foi desenvolvido por Merrick e Doudoroff (1964) que utilizaram lisozimas e desoxirribonucleases para solubilizar os peptidoglicanos e ácidos nucleicos, respectivamente, de células de *B. cereus*.

Métodos industriais de recuperação de P(3HB) incluem a digestão enzimática em conjunto com tratamento térmico à alta pressão. No entanto, estes processos resultam em alta concentração de fragmentos celulares solúveis no meio juntamente com o polímero. A centrifugação é a operação unitária mais comum para a separação de inclusões e outros materiais celulares (MIDDELBERG, 1996). Uma maior pureza do polímero será alcançada através de sucessivos passos de centrifugação e também com auxílio de detergentes (HARRISON, 1990).

O desempenho das enzimas papaína, bromelina, tripsina bovina, quimiotripsina bovina, lisozima e celulase foram avaliadas por Kapritchkoff et al. (2006) na recuperação de P(3HB) produzido por *C. necator*. O melhor resultado, P(3HB) com 88,8% de pureza, foi alcançado em digestão enzimática com 2% de bromelina a 50°C e pH 9,0. Visando melhorar a eficiência e reduzir custos com enzimas, os experimentos foram realizados com pancreatina, levando a um polímero com 90% de pureza e um custo três vezes inferior do que quando utilizada a bromelina.

Buscando métodos mais brandos de extração de P(3HB), Zuccolo et al., (1996) observaram que o tratamento enzimático de biomassa seca de *C. necator* suspensa em água com enzimas proteolíticas

comerciais de origem bacteriana (Savinase[®] e Esperase[®]) elevou o grau de pureza do polímero de 70 para até 90%.

Segundo Steinbüchel (1996), a Imperial Chemicals Industries (Monsanto) utiliza várias enzimas durante o processo de digestão enzimática para extração de PHA's. Estas enzimas são: lisozima, fosfolipase, proteinase, alcalase e outras. De acordo com o autor, o complexo enzimático hidrolisa a maior parte do material celular, o PHA permanece intacto e o filme obtido apresenta elevado grau de pureza. Braunegg et al. (1998) reportam que a Monsanto utiliza também enzimas proteolíticas, tripsina, pepsina, papaína e mistura destas enzimas na etapa de recuperação de PHA's.

Fidler e Dennis (1992) investigaram a recuperação de PHB sintetizado por *E. coli* recombinante que apresenta o gene T7 para co-expressão de lisozima. No final da fase de acúmulo de polímero, as células foram separadas do meio de cultivo e ressuspendidas em solução contendo ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA). A enzima provocou a lise da parede celular da bactéria e os grânulos de PHB foram liberados com eficiência superior a 99%.

O processo empregado por Harrison (1990) para recuperar grânulos de P(3HB) produzidos por *C. necator* envolve homogeneização por alta pressão, solubilizando os *debris* celulares com detergentes e enzimas, seguida de múltiplas centrifugações. A técnica apresentou-se eficiente tanto na ruptura quanto na remoção do material celular.

A vantagem de utilizar enzimas para lise de células reside na sua especificidade e nas condições operacionais mais brandas (KAPRITCHKOFF et al., 2006). As técnicas mencionadas acima demonstram o grande potencial do uso de enzimas para o rompimento da parede celular de bactérias como *C. necator* auxiliando a recuperação de biopolímeros com maior eficiência.

2.9 Separação industrial do polímero

O elevado custo de produção do P(3HB) e seu copolímero têm restringido a sua utilização como material plástico porque depende de vários fatores como rendimento do produto e da técnica de extração do polímero. De acordo com Ling et al. (1997), mais da metade do custo de produção de P(3HB) é associado ao processo de purificação e recuperação do polímero.

Apesar de um grande número de métodos de extração de PHA's ter sido desenvolvido (HAHN et al., 1994, BERGER et al., 1989, LEE et al., 1995), a maioria não foi testada em escala piloto (LING et al., 1997).

Métodos industriais para extração de P(3HB) incluem digestão enzimática (HOLMES e LIM, 1990) e tratamento térmico associado com homogeneização à alta pressão (HARRISON, 1991). Entretanto, processos para a remoção de *debris* celulares resultantes da ruptura celular têm recebido pouca atenção (LING et al., 1997).

A Figura 8 apresenta um exemplo de fluxograma de extração de P(3HB) em escala industrial, onde após a digestão enzimática, os *debris* celulares são removidos por centrifugação.

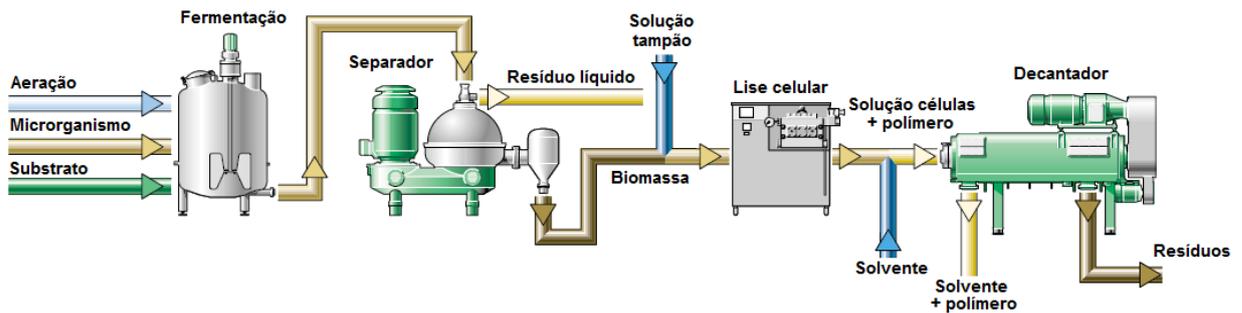


Figura 8 - Fluxograma simplificado para extração de P(3HB) em escala industrial.

Fonte: WESTFALIA SEPARATOR, 2008.

Conforme a Figura 8, em escala industrial, após o cultivo de *Cupriavidus necator*, o caldo resultante da fermentação é transferido a um separador onde a biomassa com P(3HB) intracelular é separada do meio líquido. Em seguida, esta biomassa é suspensa em solução tampão e passa pela etapa de hidrólise enzimática com condições como tempo e temperatura pré-estabelecidas. A solução tampão com as células e polímero é transferida para um decantador.

Os decantadores são equipamentos muito eficazes para realizar extração líquido-líquido com um grande teor de sólidos. A Westfalia Separator desenvolveu um decantador contínuo para tal aplicação. Este tipo de mecanismo é capaz de extrair a substância desejada diretamente da suspensão em que as células foram rompidas. Este equipamento apresenta a vantagem de não haver a necessidade de pré-filtração do meio que causa perdas diminuindo o rendimento do processo. A Figura 9 apresenta um exemplo de separador líquido-líquido com alto teor de sólidos.

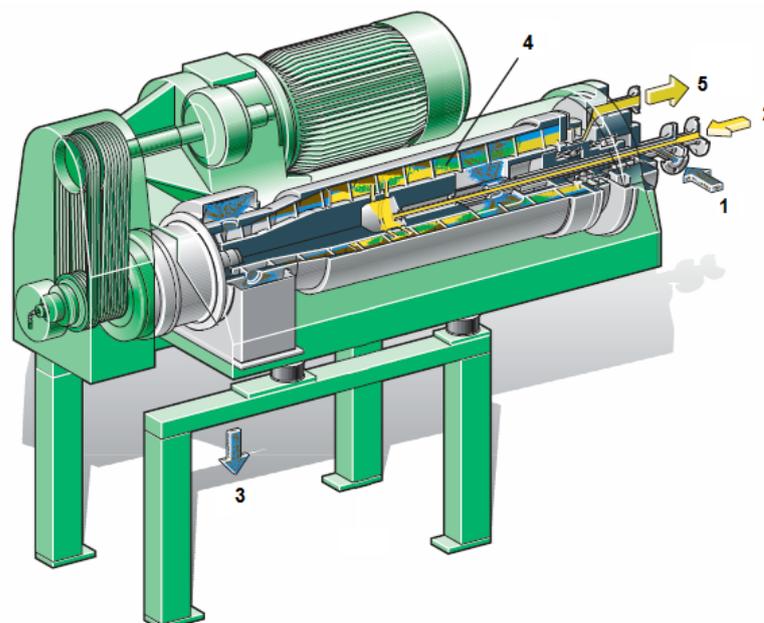


Figura 9 - Decantador para extração líquido-líquido com alto teor de conteúdo de sólidos.

Fonte: WESTFALIA SEPARATOR, 2008.

A suspensão da qual o polímero será extraído, é alimentada no equipamento através do distribuidor (1) e entra na área de extração contra-corrente (4) onde o polímero é separado por centrifugação. O resíduo líquido (solução tampão com *debris* celulares) é descarregado (3) sob ação da gravidade e o material sólido entra em contato com o solvente que é introduzido no sistema através do orifício de entrada do agente de extração (2). Finalmente, a mistura de solvente com polímero é descarregada sob pressão (5) no fluxo contrário à extração com auxílio de uma bomba centrípeta.

A utilização de diversos decantadores em seqüência possibilita a investigação da utilização de solventes como o diclorometano, nos quais, apesar de P(3HB) ser menos solúvel, são menos tóxicos e provocam menor impacto ambiental.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Em Material e Métodos são descritos os procedimentos adotados para a realização dos experimentos, bem como os equipamentos utilizados e as técnicas necessárias para a produção e extração de biopolímeros.

3.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi a bactéria *Cupriavidus necator* - DSM 545 anteriormente conhecida como *Ralstonia eutropha*. A nova classificação foi proposta pela Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Coleção de Microrganismos e Cultura de Células da Alemanha).

Para sua manutenção, foi empregado o cultivo em tubos de ensaio contendo meio sólido (ágar nutriente), com repiques mensais. Essa cultura foi mantida a 30°C durante 48 h, e a seguir armazenada em refrigerador a 4°C. A composição do ágar nutriente utilizado é de 5,0 g.L⁻¹ de peptona de carne, 3,0 g.L⁻¹ de extrato de carne e 1,5% de ágar.

3.2 Obtenção de células

Parte das células de *Cupriavidus necator* empregadas no processo de extração e recuperação de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) foram cedidas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) do Departamento de Engenharia Química e de Engenharia de Alimentos da UFSC o qual realiza cultivos para obtenção de alta densidade celular em biorreator de 5 L (BIOFLO 110, New Brunswick Scientific CO), utilizando-se volume útil de 4 L. A biomassa cedida foi lavada com água destilada, separada por centrifugação e congelada.

Também foram utilizadas células cultivadas em frascos agitados de 500 mL (*Shaker* Certomat BS-1). A reativação do microrganismo foi realizada em frasco erlenmeyer aletado de 500 mL contendo 100 mL de solução composta por 1,3% (p/v) de caldo nutriente previamente esterilizado a 121°C durante 15 min. O meio foi inoculado com três alçadas da cepa de *Cupriavidus necator* anteriormente armazenada a 4°C em ágar nutriente inclinado. Este pré-inóculo foi incubado em *shaker* a 30°C e 150 rpm por 24 h. Após este período, 10% do volume do pré-inóculo foi transferido para os frascos contendo meio de cultura.

Os cultivos foram realizados em frascos aletados de 500 mL com volume de 125 mL de meio de cultura sob agitação de 150 rpm a 30°C durante o tempo necessário para cada experimento. O pH das

suspensões foi ajustado para 7,0 e mantido ao longo dos experimentos com adição de NaOH (10%) e HCl (10%). Ao final das culturas, as células foram separadas por centrifugação e mantidas sob congelamento.

3.2.1 Testes iniciais para a produção de biomassa de *Cupriavidus necator*

Os testes iniciais para a produção de biomassa foram realizados a fim de se obter condições ótimas de crescimento de *Cupriavidus necator*. Neste experimento avaliou-se a influência de diferentes concentrações de glicose, uréia e solução de oligoelementos no crescimento da bactéria. As concentrações dos componentes bem como a composição da solução concentrada de oligoelementos foram tomadas de dados na literatura sobre cultivos de *C. necator* (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005b).

As Tabelas 2 e 3 apresentam a composição dos nutrientes utilizados do meio para a produção de biomassa e a composição da solução concentrada de oligoelementos, respectivamente.

Tabela 2 - Composição do meio de cultura.

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Extrato de levedura	0,5
CaCl ₂	0,01
KH ₂ PO ₄	1,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Na ₂ HPO ₄ (g.L ⁻¹)	4

Tabela 3 - Composição da solução concentrada de oligoelementos.

Elemento	Concentração (g.L ⁻¹)
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,6
H ₃ BO ₃	0,6
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,3

As Tabelas 4 e 5 apresentam a matriz do planejamento fatorial 2³, em duplicata, e os níveis dos componentes utilizados, respectivamente, para a avaliação da influência dos componentes no crescimento de *C. necator*.

Tabela 4 - Matriz do planejamento fatorial 2³ de avaliação do crescimento de *Cupriavidus necator*.

Ensaio	Glicose	Uréia	Oligoelementos
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

Tabela 5 - Níveis dos componentes utilizados no planejamento fatorial.

Componente	Nível +1	Nível - 1
Glicose (g.L ⁻¹)	40	20
Uréia (g.L ⁻¹)	3	2
Oligoelementos (mL.L ⁻¹)	15	5

Durante o preparo do meio de cultura, cada sal e a glicose foram esterilizados separadamente para evitar uma possível reação dos componentes e precipitação dos sais.

3.2.2 Influência de diferentes concentrações de uréia, KH₂PO₄ e Na₂HPO₄ na produção de biomassa de *Cupriavidus necator* e P(3HB)

Em cultivos de *Cupriavidus necator* visando a produção de P(3HB) estão envolvidos diversos fatores que influenciam no mecanismo de sintetização do polímero pela bactéria, desta forma, foi realizado um planejamento fatorial para alcançar a otimização destes fatores. Nestes ensaios avaliou-se influência de novos níveis de concentrações de uréia além dos sais KH₂PO₄ e Na₂HPO₄ na produção células e P(3HB).

Na Tabela 6 estão apresentados os elementos não variáveis que compõe o meio de cultivo.

Tabela 6 - Composição do meio de cultura.

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Glicose	40
Extrato de levedura	0,5
CaCl ₂	0,01
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Solução oligoelementos	15 mL.L ⁻¹

As Tabelas 7 e 8 apresentam a matriz do planejamento fatorial 2^3 , em duplicata, e os níveis dos componentes utilizados, respectivamente, para a avaliação da influência de uréia, KH_2PO_4 e Na_2HPO_4 na produção de P(3HB).

Tabela 7 - Matriz do planejamento fatorial 2^3 para uréia e sais.

Ensaio	Uréia	KH_2PO_4	Na_2HPO_4
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

Tabela 8 - Níveis dos compostos variados no planejamento fatorial.

Componente	Nível +1	Nível -1
Uréia (g.L^{-1})	2	1
KH_2PO_4 (g.L^{-1})	3	1,5
Na_2HPO_4 (g.L^{-1})	4	0,6

3.3 Técnicas analíticas

3.3.1 Amostragem

Nos ensaios em frascos agitados, a amostragem foi realizada em menores proporções, devido ao menor volume de amostra disponível. Durante as culturas, eram retiradas amostras de 2 mL para leitura de pH e análise da concentração de açúcares.

Ao final dos cultivos, alíquotas de 2 mL eram centrifugadas em tubos *ependorf* sendo que do sobrenadante eram feitas as análises de substrato e o precipitado foi lavado duas vezes com água destilada, e após a última centrifugação, foi congelado para posterior análise de polímeros.

3.3.2 Determinação da concentração de biomassa

3.3.2.1 Medida por espectrofotometria

A concentração celular do pré-inóculo foi avaliada em um espectrofotômetro (modelo GENESYS 10 Vis, marca Spectronic Unicam, USA) medindo-se a absorbância a 600 nm. Para manter uma precisão adequada (região linear), a faixa de absorbância utilizada foi entre 0,0 e 0,8. A partir deste valor, foram feitas diluições para manter a linearidade. A medida por espectrofotometria foi realizada em triplicata.

3.3.2.2 Medida por gravimetria

Nos cultivos em frascos agitados, a determinação por gravimetria foi realizada apenas no final da cultura. A concentração celular por gravimetria foi obtida a partir de um volume conhecido de cultura (2 mL). O meio de cultura foi centrifugado em tubos *ependorf* de 2 mL cada, previamente secos e pesados, a 14000 rpm, e o precipitado foi ressuspensão com água destilada e centrifugado duas vezes para a lavagem, seguido de secagem em estufa a 105°C por 24 h. A amostragem foi realizada em triplicata.

3.3.3 Concentração de açúcares

A concentração e consumo de glicose foram avaliados através do *kit* Glicose PP que determina a concentração do açúcar pelo método enzimático-colorimétrico. Com o auxílio de uma curva padrão previamente realizada, a concentração de glicose foi obtida com a absorbância lida em espectrofotômetro a 500 nm. A curva padrão expressa a concentração de glicose (g.L^{-1}) versus absorbância em uma escala compreendida entre 0 e 40 g.L^{-1} de glicose (Anexos, Figura A.1).

3.3.4 Quantificação de P(3HB)

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

As amostras, com volume conhecido de meio de cultura, foram centrifugadas a 14000 rpm por 3 minutos. O precipitado foi lavado duas vezes com água destilada e congelado para posterior análise. Após descongelamento, o precipitado foi ressuspensão em um volume de 2 mL de clorofórmio e 2 mL de metanol acidificado (H_2SO_4 15%), contendo ácido benzóico 0,4 g.L^{-1} como padrão interno, com agitação em vórtex e a mistura foi então aquecida a 100°C durante 140 minutos. Depois de 1 h de aquecimento, a mistura foi agitada durante alguns segundos e devolvida ao aquecimento. Após resfriamento em banho de gelo, adicionou-se 1 mL de água destilada e as amostras foram agitadas durante 30 segundos, seguido de decantação. A fase orgânica (inferior) foi retirada com uma pipeta Pasteur e armazenada sob refrigeração

para posterior análise em cromatografia gasosa. A curva padrão foi feita utilizando-se o poli-3-hidroxi-butirato (Sigma), como padrão externo, com massa variando entre 0,001 g a 0,03 g. A curva padrão é estabelecida através da relação das áreas de P(3HB)/padrão interno pela massa de polímero. Submeteu-se os padrões à mesma metanólise que as amostras, a curva se encontra em Anexos na Figura A.2.

3.3.4.1 Cromatografia gasosa

A coluna utilizada para dosagem do P(3HB) foi de sílica fundida (\varnothing 0,53mm X 30m) modelo Supercowax-10. O cromatógrafo foi um CG-90 equipado com um detector de ionização de chama (DIC ar-hidrogênio). O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio a 30 mL/min e as temperaturas de injeção, detecção e coluna foram respectivamente de 190°C, 230°C e 90°C, essa condição de coluna foi usada para os cultivos em resíduo amiláceo. Para os cultivos utilizando como fonte de carbono a glicose, foi utilizado uma rampa de aquecimento com as seguintes condições: temperatura inicial da coluna de 60°C, temperatura final de 110°C, taxa de aquecimento de 7°C.min⁻¹ e taxa de resfriamento de 35°C.min⁻¹. O volume injetado foi de 2 μ L. As diferentes condições utilizadas para análise cromatográfica se deve exclusivamente às condições do aparelho utilizado. A integração e os cromatogramas foram obtidos através do *software* Clarity Lite (DataApex[®]). Um exemplo de cromatograma pode ser visto em Anexos na Figura A.3.

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

A porcentagem de recuperação de P(3HB) foi obtida através da Equação 1.

$$\% \text{recuperação} = \frac{m_{pol.ext.}}{m_{pol.cél.}} \cdot 100 \quad (1)$$

Onde: $m_{pol.ext.}$ é a massa de polímero extraído e $m_{pol.cél.}$ é a massa de polímero no interior das células mensurada por cromatografia gasosa.

A pureza dos filmes foi calculada através da Equação 2.

$$\% \text{pureza} = \frac{m_{PHA}}{m_{filme}} \cdot 100 \quad (2)$$

Onde: $m_{P(3HB)}$ é a massa de P(3HB) contida no filme, detectada por cromatografia m_{filme} é a massa total do filme utilizada para a análise cromatográfica.

3.4 Metodologia de extração

3.4.1 Preparo das células para hidrólise

Após o descongelamento da biomassa proveniente de cada cultivo, eram preparadas, em erlenmeyers de 250 mL, suspensões com 2% (p/v) de células em 100 mL de tampão. A etapa seguinte consiste no tratamento térmico. As células em tampão foram tratadas termicamente em autoclave durante 15 min a 121°C para desestabilizar a parede celular. Adicionava-se a enzima na etapa de hidrólise enzimática conduzida em banho térmico agitado.

3.4.2 Procedimento de extração de polímero

Para realizar a extração do polímero contido nas células, 4 mL do material submetido ao banho térmico foi centrifugado em tubos *ependorf* durante 3 min a 14000 rpm. Após o descarte do sobrenadante da segunda centrifugação, já que o volume útil dos tubos é de 2 mL, adicionava-se 1 mL do solvente. Todas as extrações foram realizadas em triplicata.

Os tubos com células e solvente foram novamente centrifugados e posteriormente retirou-se as soluções solvente-polímero com o auxílio de uma seringa. Estas soluções foram pesadas em placas Petri previamente taradas.

A evaporação do solvente foi conduzida em uma cuba de vidro totalmente fechada no período de 24 h. Para confirmar a evaporação total dos solventes, as placas foram colocadas em estufa a 80°C por 4 h. Em seguida, estas foram novamente pesadas para o cálculo da porcentagem de polímero recuperado. A Figura 10 apresenta o fluxograma do procedimento de extração do polímero.

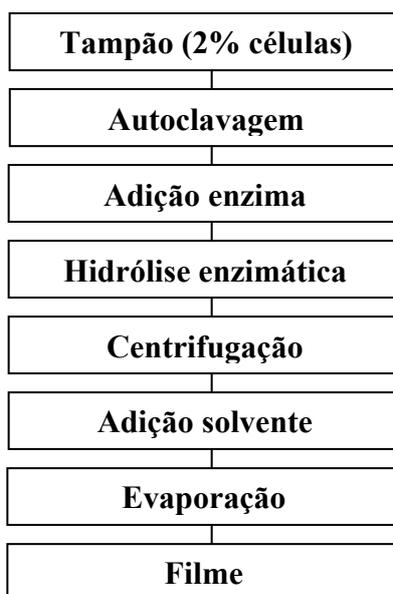


Figura 10 - Fluxograma da extração de polímero.

3.4.3 Enzimas

A fim de hidrolisar a estrutura da parede celular da bactéria *Cupriavidus necator*, foram realizados experimentos com as seguintes enzimas: Alcalase[®] fornecida pela Novozymes; Corolase[®] L10, Corolase[®] 7089, Corolase[®] PP, Rohalase[®] Barley, Rohalase[®] BX e Rohament[®] CL cedidas pela AB Enzymes; Celumax[®] BC e Protemax[®] FC da Prozyn BioSolutions.

3.4.3.1 Alcalase[®] 2.4L

Alcalase[®] 2.4L é uma endoprotease produzida a partir da fermentação de *Bacillus licheniformis*. Tem um bom desempenho em pH na faixa entre 6,0 e 8,0. A temperatura de utilização encontra-se na faixa de 55 - 60°C.

É adequada para utilização em preparações de imersão, assim como meios líquidos. É um produto líquido de densidade de 1,25 g.mL⁻¹ e a concentração indicada é de 2% sobre conteúdo de proteína da matéria prima mas depende do pH e temperatura do meio.

Esta enzima é utilizada em produtos de limpeza para remover manchas à base de proteínas.

3.4.3.2 Celumax[®] BC

Celumax[®] BC é um sistema de enzimas à base de mananase, celulase e hemicelulase. É um pó de coloração levemente castanha. O pH ótimo é de 4,0 e a temperatura ótima é de 60°C, acima deste valor a enzima é rapidamente inativada.

A concentração adequada deve ser obtida através de testes práticos, pois varia de acordo com o processo e a qualidade da matéria-prima. O fornecedor recomenda a utilização de 0,02 a 0,1% em base de substrato seco.

Esta enzima é aplicada na degradação de substâncias derivadas da parede celular de plantas. O produto pode ser usado no processamento de café instantâneo e no descascamento enzimático da soja.

3.4.3.3 Corolase[®] 7089

Corolase[®] 7089 é uma enzima proteolítica que contém exclusivamente endoprotease, obtida a partir de culturas de *Bacillus subtilis*. É um produto líquido de cor castanho claro e com odor característico. O pH ótimo é de 7,2 e a temperatura ótima é 55°C. A massa específica é de 1,15 g.mL⁻¹.

A concentração recomendada para esta enzima varia entre 0,01 e 0,5% e depende do substrato, grau de hidrólise desejada, condições de reação (tempo, temperatura e pH).

Corolase[®] 7089 é utilizada para a hidrólise de proteínas provenientes de diversas fontes. Alguns exemplos de aplicações especiais são: hidrólise de glúten de trigo, gelatina, de peixe e de proteínas do leite, como enzima única ou em combinação com outras proteases.

3.4.3.4 Corolase[®] L10

Corolase[®] L10 é uma protease a base de papaína obtida a partir de "Papaya carica" que quebra proteínas, em uma ampla faixa de pH. É um produto líquido de cor amarelo claro com odor característico. O melhor pH para uso é entre 3,0 e 9,0. Para otimizar a eficiência recomenda-se uma temperatura de 50 - 70°C. Massa específica: 1,2 g.mL⁻¹.

A concentração recomendada é de 0,01 - 0,5% dependendo das condições de reação e do tipo de proteína do substrato. Esta enzima pode ser utilizada no processamento de alimentos a base de proteínas de origem vegetal e animal.

3.4.3.5 Corolase[®] PP

Corolase PP[®] contém enzimas proteolíticas como endoprotease. Atua melhor em pH neutro e ligeiramente alcalino. É obtido a partir de glândulas do pâncreas suíno.

É um pó de cor bege com odor característico. O melhor pH para uso é entre 7,5 - 9,0 e a temperatura ótima encontra-se na faixa de 45 - 50°C. Dependendo do substrato e das condições de reação, a dose pode variar entre 0,01 - 0,5% de proteína.

Este produto degrada numerosas proteínas de origem vegetal e animal usadas na tecnologia de alimentos. A enzima exibe a sua melhor atividade em substratos que possuam caseína, proteína de soja e glúten.

3.4.3.6 Protemax[®] FC

Protemax[®] FC é um produto constituído a base de endo/exo-peptidases de grau alimentício derivadas de uma cepa selecionada não modificada geneticamente do *Aspergillus oryzae*. É um pó de cor creme-amarronzado. A faixa de pH recomendada de atuação é de 6,0 a 9,0, com um ótimo em 7,0 - 7,5. A atividade da enzima é efetiva nas temperaturas de 25 a 60°C, com um ótimo em 50°C.

A quantidade de enzima a ser adicionada varia de acordo com o tipo de processo utilizado. Em geral, para degradação protéica, recomenda-se inicialmente trabalhar com dosagens de 0,01 - 0,05%, baseado na massa protéica como ponto de partida.

Tem sido largamente aplicada para hidrolisar proteínas, tirar o amargor de hidrolisados de proteínas, reduzir rapidamente a viscosidade das soluções de proteínas solúveis e géis protéicos e para a solubilização e modificação de proteínas.

3.4.3.7 Rohalase[®] Barley

Rohalase[®] Barley é um complexo enzimático, que contém predominantemente β -glucanase, além de outras enzimas tais como celulase e de endoxilanase. É obtida a partir de culturas de *Trichoderma reesei*.

É um produto granulado de cor marrom, parcialmente solúvel em água e é mais eficiente sob as seguintes condições: pH entre 4,0 e 7,0 e a temperatura na faixa de 40 - 70°C. A posologia recomendada é de 0,05 - 0,1%

Esta enzima é aplicada no processamento de cerveja para compensar possível qualidade inferior do malte além de reduzir a viscosidade da bebida prevenindo também a turbidez.

3.4.3.8 Rohalase[®] BX

É uma preparação β -glucanase com alto teor de β -1.3 - e β -1.6-glucanase obtida de uma cultura específica de uma cepa modificada de *Trichoderma*. A enzima apresenta alta atividade proteolítica e

encontra-se na forma de um pó de coloração bege com odor aromático. O pH ótimo situa-se entre 3,0 e 4,0 e a temperatura de atuação varia entre 40 e 50°C.

Rohalase[®] BX é adequada para o processo de filtração de vinhos e cervejas, onde a clarificação é significativamente melhorada. É também utilizada para lise de células de levedura.

3.4.3.9 Rohament[®] CL

Rohament[®] CL degrada celulose formando outros polissacarídeos. Funciona melhor em pH ligeiramente ácido. É obtida a partir de culturas de *Trichoderma reesei*.

É um líquido de cor marrom com odor característico e peso específico de 1,1 g.mL⁻¹. O pH ótimo é de 4,5 e a temperatura ótima se encontra entre 60 e 65°C. A concentração recomendada é de 0,05 - 0,1%.

Esta enzima é utilizada no melhoramento do processo de filtração de glúten resultando maiores taxas de filtração e melhor secagem.

3.5 Análise estatística

Para avaliação da recuperação de polímero, foi utilizado o teste de Tukey HSD do Programa Statistica (versão 8.0) com o qual avaliou-se se houve diferença significativa entre as médias das amostras num nível de significância de 5%. Um exemplo de resposta obtida com o teste de Tukey encontra-se em Anexos na Figura A.4.

3.6 Influência do tipo de solvente e tempo de hidrólise sobre a extração de P(3HB)

Com a biomassa produzida em biorreator de 5 L, foram preparadas suspensões contendo 2% (p/v) de células em tampão Tris-HCl com pH 7,5. Estas suspensões foram tratadas termicamente em autoclave durante 15 min a 121°C. Nestes ensaios, utilizou-se alíquotas de 100 µL da enzima Alcalase[®] 2.4L na etapa de hidrólise enzimática que foi conduzida em banho térmico agitado a 100 rpm e 60°C, temperatura essa que se encontra na faixa ótima de utilização da enzima.

A extração do polímero foi realizada com 1 mL dos seguintes solventes: diclorometano, clorofórmio e álcool citrus o qual é obtido no processo de fermentação alcoólica do melão do suco de laranja. A Tabela 9 apresenta a composição do álcool citrus obtida através de análise cromatográfica.

Tabela 9 - Composição do álcool citrus.

Composição	Concentração (mg.L ⁻¹)	%
Acetaldeído	306	0,60
Acetona	269	0,53
Acetato de Etila	397	0,78
Metanol	46556	91,81
Sec-butanol	30	0,06
Propanol	1576	3,11
Isobutanol	13	0,02
Acetato de Isoamila	17	0,03
n-Butanol	4	0,007
d-Limoneno	1515	2,98
Álcool isoamílico	0	0
Álcool amílico	23	0,04

Fonte: Citrosuco, 2007.

Após a etapa de extração, a evaporação dos solventes clorofórmio e diclorometano foi conduzida em placas de Petri mantidas em cuba de vidro enquanto que o álcool citrus foi evaporado em capela com ventilação ligada no período de 24 h.

As hidrólises enzimáticas realizadas com os diferentes tipos de enzimas foram realizadas em duplicata enquanto que as extrações foram feitas em triplicata.

3.7 Extração de P(3HB) com diferentes tipos de enzimas

As células utilizadas nestes testes foram cultivadas em biorreator de 5 L com as quais foram preparadas suspensões contendo 2% (p/v) de células em meio tamponante específico para cada enzima utilizada. A Tabela 10 apresenta as enzimas empregadas nas extrações com suas respectivas soluções tampão e pH.

Tabela 10 - Solução tampão e pH para cada enzima.

Enzima	Solução Tampão	pH
Alcalase [®] 2.4L	Tris-HCl	7,5
Celumax [®] BC	Acetato	4,0
Corolase [®] 7089	Tris-HCl	7,5
Corolase [®] L10	Acetato	5,5
Corolase [®] PP	Tris-HCl	9,0
Protamax [®] FC	Tris-HCl	7,5
Rohalase [®] Barley	Acetato	5,5
Rohalase [®] BX	Acetato	4,0
Rohament [®] CL	Acetato	4,0

As enzimas foram utilizadas de acordo com as recomendações dos fabricantes que sugerem a concentração máxima entre 0,05 e 0,5% sobre extrato de células secas. Nos primeiros ensaios adotou-se a concentração de 0,5% (p/p) para todas as enzimas testadas.

A hidrólise enzimática foi conduzida durante 1,5 h em banho térmico agitado a 100 rpm e 60°C e os polímeros foram extraídos com 1 mL de clorofórmio.

As hidrólises enzimáticas foram realizadas em duplicata e as extrações em triplicata.

3.6 Otimização das condições para atividade da enzima Celumax[®] BC

Neste experimento as células utilizadas para a extração de biopolímero foram cultivadas em biorreator de 5 L. Posteriormente ao descongelamento da biomassa, foram preparadas suspensões contendo 2% (p/v) de células em tampão acetato. As células em tampão foram tratadas termicamente em autoclave durante 15 min a 121 °C. A enzima foi adicionada na etapa de hidrólise enzimática que foi conduzida em banho térmico agitado. Após a hidrólise enzimática, cada solução foi centrifugada e o polímero extraído com 1 mL de clorofórmio. Em seguida à evaporação do solvente em placas de Petri, os filmes de P(3HB-co-3HV) foram pesados. A pureza dos filmes foi obtida através de cromatografia gasosa.

Buscando encontrar as melhores condições de operação da enzima Celumax BC[®], utilizou-se planejamentos fatoriais. As combinações específicas dos fatores foram testadas em 8 ensaios, sendo que as hidrólises foram realizadas em duplicata e as extrações do polímero em triplicata.

No primeiro planejamento, variou-se o pH do meio tamponante, a concentração de enzima em relação à massa de células secas, a temperatura e o tempo do banho para hidrólise enzimática. As Tabelas 11 e 12 apresentam dados do primeiro planejamento fatorial 2⁴⁻¹, em duplicata, para otimização das condições de operação da enzima Celumax[®] BC.

Tabela 11 - Matriz do planejamento fatorial 2^{4-1} sobre o efeito dos parâmetros pH, temperatura (T), concentração de enzima ([E]) e tempo (t) na ação da enzima Celumax[®] BC.

Ensaio	pH	T(°C)	[E] (%) (p/p)	t (h)
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1

Tabela 12 - Níveis dos parâmetros utilizados no primeiro planejamento fatorial.

Parâmetro	Nível +1	Nível -1
pH	4,5	4
T(°C)	70	60
[E] (%) (p/p)	0,1	0,02
t (h)	1,5	1

As Tabelas 13 e 14 apresentam dados do segundo planejamento fatorial 2^3 , em duplicata, para otimização das condições de operação da enzima Celumax[®] BC.

Tabela 13 - Matriz do planejamento fatorial 2^3 dos parâmetros: pH, concentração de enzima ([E]) e tratamento térmico (T T) para Celumax[®] BC.

Ensaio	pH	[E] (%) (p/p)	T T
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

Tabela 14 - Níveis dos parâmetros utilizados no segundo planejamento.

Parâmetro	Nível +1	Nível -1
pH	4,2	4
[E] (%) (p/p)	0,02	0,01
T T	com	sem

3.7 Avaliação do número de extrações de P(3HB) com diclorometano

As células utilizadas nestes ensaios para a extração de biopolímero com diclorometano foram cultivadas em frascos agitados. Com a biomassa, foi preparada uma suspensão contendo 2% (p/v) de células em tampão acetato que foi tratada termicamente em autoclave durante 15 min a 121 °C.

Adicionou-se 0,02% (p/p) da enzima Celumax[®] BC à suspensão e a hidrólise enzimática foi conduzida em banho térmico agitado a 60°C durante 1 h. Após este período, 2 mL da suspensão foi centrifugada em tubo *ependorf* e realizou-se a extração de P(3HB) com diclorometano em cinco estágios.

No primeiro estágio, adicionou-se 1,5 mL de diclorometano ao precipitado e, após centrifugação durante 3 min a 14000 rpm, a mistura de solvente e polímero foi transferida para uma placa de Petri para evaporação. No segundo estágio, adicionou-se 1 mL do solvente ao mesmo precipitado e, após a centrifugação, o solvente juntamente com P(3HB) foi transferido para uma segunda placa. O mesmo procedimento foi realizado para os demais estágios.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Testes iniciais para a produção de biomassa de *Cupriavidus necator*

O presente estudo preliminar foi realizado a fim de se obter condições favoráveis ao crescimento de *C. necator* para posteriores ensaios para obtenção de concentrações adequadas de nutrientes para produção de P(3HB).

Os cultivos tiveram duração de 48 h, pois este foi o período que a bactéria levou para consumir a glicose do meio.

A fonte de nitrogênio é um fator importante para o crescimento celular. Khanna e Srivastava (2005b) testaram o sulfato de amônio, uréia, cloreto de amônio e nitrato de amônio como fontes de nitrogênio em concentrações equivalentes a quantidade de nitrogênio de cada sal no cultivo de *C. necator*. A maior biomassa (7,9 g.L⁻¹) foi alcançada no experimento realizado com uréia, seguido pelo ensaio com cloreto de amônio onde obtiveram 6,7 g.L⁻¹ de células. Baseado nestes dados, a uréia foi adotada com a fonte de nitrogênio nos ensaios realizados em frascos agitados.

As concentrações de glicose avaliadas foram 20 e 40 g.L⁻¹. Estes valores foram testados com base em dados da literatura sobre cultivo de *C. necator* em meio contendo glicose como principal fonte de carbono. Ienczack (2006) observou que concentrações de ART acima de 40 g.L⁻¹ causam inibição do crescimento de *C. necator*. Este fenômeno também foi observado por Fiorese (2008) em concentrações abaixo de 10 - 12 g.L⁻¹.

Com o objetivo de analisar o comportamento dos oligoelementos no crescimento da bactéria, foram avaliadas as concentrações de 5 e 15 mL.L⁻¹ destes elementos traço.

A Tabela 15 apresenta a biomassa, juntamente com a análise estatística, obtida através do planejamento fatorial de otimização das condições de cultivo.

Tabela 15 - Biomassa para o planejamento fatorial de otimização das condições de cultivo de *C. necator*.

Ensaio	Glicose (g.L ⁻¹)	Uréia (g.L ⁻¹)	Oligoelementos (mL.L ⁻¹)	Biomassa (g.L ⁻¹)
1	(-) 20	(-) 2	(-) 5	8,2±0,4 ^{abc}
2	(+) 40	(-) 2	(-) 5	9,4±0,1 ^{ad}
3	(-) 20	(+) 3	(-) 5	7,1±0,2 ^{ce}
4	(+) 40	(+) 3	(-) 5	8,9±0,4 ^{adf}
5	(-) 20	(-) 2	(+) 15	8,5±0,5 ^{cd}
6	(+) 40	(-) 2	(+) 15	9,9±0,4 ^d
7	(-) 20	(+) 3	(+) 15	7,6±0,1 ^{cf}
8	(+) 40	(+) 3	(+) 15	9,3±0,2 ^{bd}

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey HSD, (p≥0,05).

A análise estatística do experimento mostrou que, embora as concentrações de biomassa entre a maioria dos ensaios não diferiram estatisticamente, o melhor resultado foi alcançado no ensaio 6 onde a biomassa produzida foi de 9,9 g.L⁻¹. Neste ensaio, a concentração de glicose foi de 40 g.L⁻¹. Ienczak (2006) utilizou melaço como fonte de carbono na concentração de 40 g.L⁻¹ de ART durante o cultivo de *C. necator* e obteve uma biomassa total de 18 g.L⁻¹. Estes resultados indicam que esta concentração de açúcar é ideal para o cultivo da bactéria.

A fonte de nitrogênio é essencial para o aumento da biomassa bacteriana devido à necessidade deste elemento durante a reprodução celular. Segundo Aragão (1996), a concentração inicial da fonte de nitrogênio ((NH₄)₂SO₄) no meio comumente utilizada é de 2,3 g.L⁻¹, suficiente para a obtenção de 5,0 g.L⁻¹. No ensaio 6 obteve-se o dobro desta concentração celular com 2 g.L⁻¹ de uréia.

Além das fontes de carbono e nitrogênio, diversos elementos são essenciais para o crescimento celular. No planejamento fatorial, os ensaios 2 e 6, diferem apenas na concentração dos oligoelementos. Como mostrado na Tabela 15, com um nível de significância de 5%, não houve diferença na biomassa obtida ao final dos dois cultivos, que foram de 9,4 e 9,9 g.L⁻¹, respectivamente. Em estudos realizados por Khanna e Srivastava (2005b), as concentrações de 5 e 15 mL.L⁻¹ de solução de oligoelementos foram variadas no planejamento fatorial. Os autores concluem que, para a produção de biomassa, o ideal é a utilização da menor concentração de metais traço, entretanto, a produção de biopolímero foi maior com um teor de 15 mL.L⁻¹ destes compostos.

Para melhor visualização dos resultados, a Figura 11 apresenta os gráficos de análise do efeito dos diferentes níveis de concentração de glicose, uréia e oligoelementos no crescimento bacteriano.

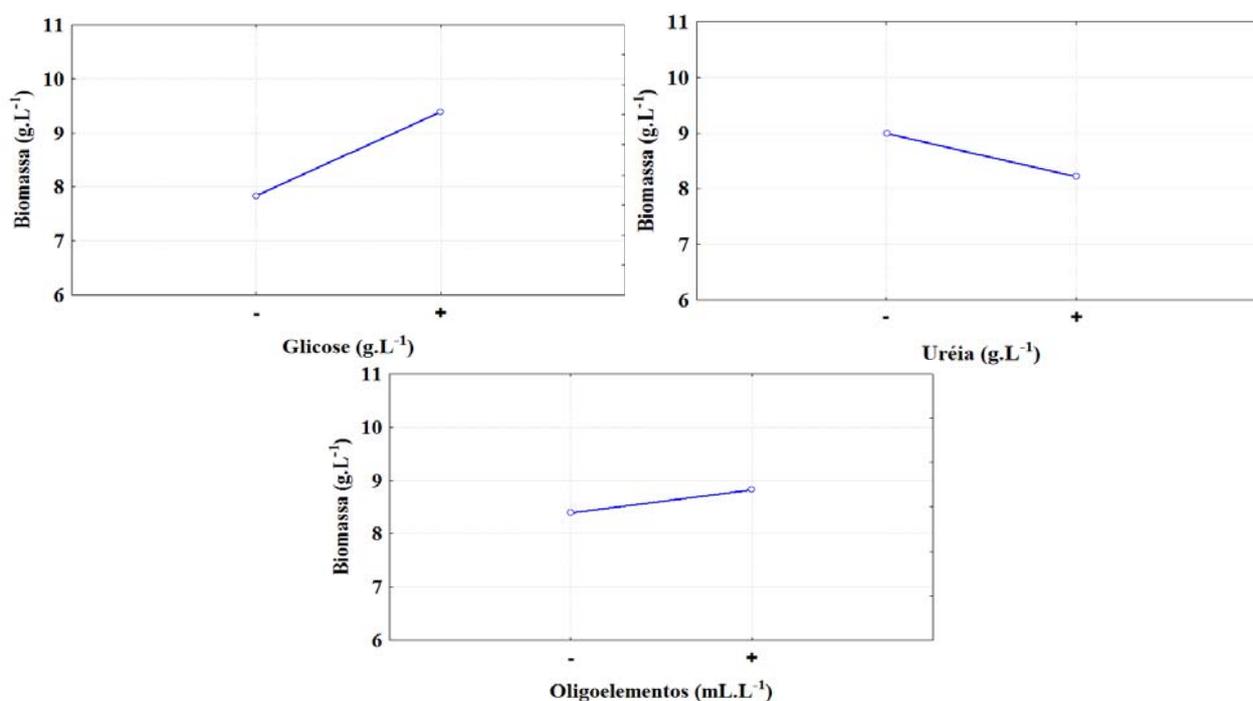


Figura 11 - Gráficos da análise do efeito das concentrações de glicose, uréia e oligoelementos sobre a produção de biomassa de *C. necator*.

Como pode-se observar na Figura 11, o nutriente mais importante durante o crescimento celular foi a glicose no nível superior (40 g.L^{-1}). A diminuição na concentração de açúcar para 20 g.L^{-1} levou a uma queda da concentração de biomassa. Koutinas et al. (2007) utilizaram baixo teor de glicose (10 g.L^{-1}) durante o cultivo de *Cupriavidus necator*. Com esta concentração de substrato a biomassa obtida foi de 5 g.L^{-1} , valor inferior aos encontrados neste trabalho. Através da análise destes dados, em experimentos posteriores, a concentração de glicose adotada foi de 40 g.L^{-1} .

A concentração de uréia não foi proporcional ao crescimento celular já que a maior quantidade de biomassa foi obtida com o nível inferior (2 g.L^{-1}) do composto. Em grande parte dos cultivos de *C. necator* encontrados na literatura, o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ é utilizado como principal fonte de nitrogênio, entretanto, a uréia apresenta vantagem sobre o sulfato por atenuar flutuações no pH, diminuindo gastos com soluções de HCl e NaOH utilizadas para corrigir o pH do meio.

Apesar da concentração de oligoelementos ser muito baixa no meio de cultura, estes compostos participam do crescimento celular. Esta participação foi maior no nível superior (15 mL.L^{-1}), como mostrado na Figura 11. Como reportado por Khanna e Srivastava (2005b), a sintetização de polímero pela bactéria aumenta no meio com maior teor de elementos traço, portanto, nos futuros ensaios em *shaker*, a concentração utilizada para esta solução foi de 15 mL.L^{-1} .

Estes resultados mostram a importância do balanceamento dos nutrientes do meio de cultivo para um aumento na concentração celular.

4.2 Influência de diferentes concentrações de uréia, KH_2PO_4 e Na_2HPO_4 na produção de biomassa de *Cupriavidus necator* e P(3HB)

O planejamento fatorial foi realizado para determinar as melhores concentrações de uréia, KH_2PO_4 e Na_2HPO_4 para crescimento celular e produção de P(3HB) por *C. necator*.

Com base no ensaio preliminar, nos cultivos realizados em frascos agitados, a concentração de glicose utilizada foi de 40 g.L^{-1} . Ienczak (2006) avaliou a produção de P(3HB) por *C. necator* em meios contendo 30, 40, 50, 60 e 70 g.L^{-1} de açúcares redutores totais (ART) e a produção de polímero foi maior (38%) no meio contendo 40 g.L^{-1} de ART.

A uréia foi utilizada nas concentrações de 1 e 2 g.L^{-1} , esta fonte de nitrogênio facilita controles analíticos do meio cultura evitando sucessivas correções de pH. Beaulieu et al. (1995) utilizaram sulfato de amônio com fonte de nitrogênio no cultivo de *C. necator* e observaram flutuações no pH do meio de cultivo entre 2,12 e 6,9, sendo que em pH 5,4 houve morte celular cessando o crescimento da bactéria. Os autores reportaram a possível substituição do sulfato de amônio pela uréia para diminuir a variação do pH.

Os cultivos foram conduzidos durante 52 h, período que o microrganismo levou para consumir a glicose do meio. Este tempo é maior do que os reportados na literatura, pois as células são transferidas do pré-inóculo para os frascos onde o cultivo é conduzido, sem passar pelo segundo pré-inóculo, onde a maioria dos autores submete a bactéria a uma fase de adaptação.

A Tabela 16 apresenta as concentrações de biomassa e P(3HB) obtidos através do planejamento fatorial.

Tabela 16 - Concentrações de biomassa e P(3HB) obtidas com o planejamento fatorial de otimização das condições de cultivo de *C. necator*.

Ensaio	Uréia	KH ₂ PO ₄	Na ₂ HPO ₄	Biomassa (g.L ⁻¹)	P(3HB) (g.L ⁻¹)
1	(-) 1	(-) 1,5	(-) 0,6	6,8±0,5 ^a	3,7±0,5 ^{ac}
2	(+) 2	(-) 1,5	(-) 0,6	9,8±0,7 ^{bc}	6,9±0,7 ^b
3	(-) 1	(+) 3	(-) 0,6	7,0±0,5 ^a	3,1±0,2 ^a
4	(+) 2	(+) 3	(-) 0,6	10,2±0,8 ^b	6,3±0,5 ^b
5	(-) 1	(-) 1,5	(+) 4	7,3±0,6 ^{ac}	2,5±0,4 ^a
6	(+) 2	(-) 1,5	(+) 4	10,7±0,7 ^b	5,8±0,5 ^b
7	(-) 1	(+) 3	(+) 4	7,5±0,5 ^{ac}	2,3±0,2 ^a
8	(+) 2	(+) 3	(+) 4	11,3±0,8 ^b	5,1±0,4 ^{bc}

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey HSD, (p≥0,05).

* As concentrações de uréia, KH₂PO₄ e Na₂HPO₄ encontram-se em (g.L⁻¹)

A Tabela 16 mostra que, nos ensaios submetidos ao nível inferior da fonte de nitrogênio (1 g.L⁻¹), tanto a concentração de biomassa quanto o teor de P(3HB) nas células foram estatisticamente menores do que nos testes com 2 g.L⁻¹ de uréia.

Em estudos de produção de biomassa e P(3HB) por *C. necator*, Garcia (2006) utilizou meio de cultivo contendo 30 g.L⁻¹ de glicose/frutose e 2,3 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄. Ao final da fase de produção, a biomassa total foi de 12 g.L⁻¹ e a concentração de P(3HB) no interior das células foi de 5,2 g.L⁻¹, o que representou um acúmulo total de P(3HB) de 44%. Situação parecida ocorreu no ensaio 8, onde apesar da concentração celular ter sido de 11,3 g.L⁻¹, o acúmulo de polímero foi de apenas 45,1% (5,1 g.L⁻¹).

No ensaio 2, obteve-se biomassa de 9,8 g.L⁻¹ com a maior concentração de polímero (6,9 g.L⁻¹), que corresponde a um acúmulo de 70,4%. Estes resultados demonstram que este ensaio foi o que apresentou melhores concentrações de uréia (2 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (1,5 g.L⁻¹) e Na₂HPO₄ (0,6 g.L⁻¹) para produção de P(3HB).

As Figuras 12 e 13 apresentam os gráficos de análise do efeito dos diferentes níveis de concentração de uréia, KH₂PO₄ e Na₂HPO₄ no crescimento bacteriano e no acúmulo de P(3HB), respectivamente.

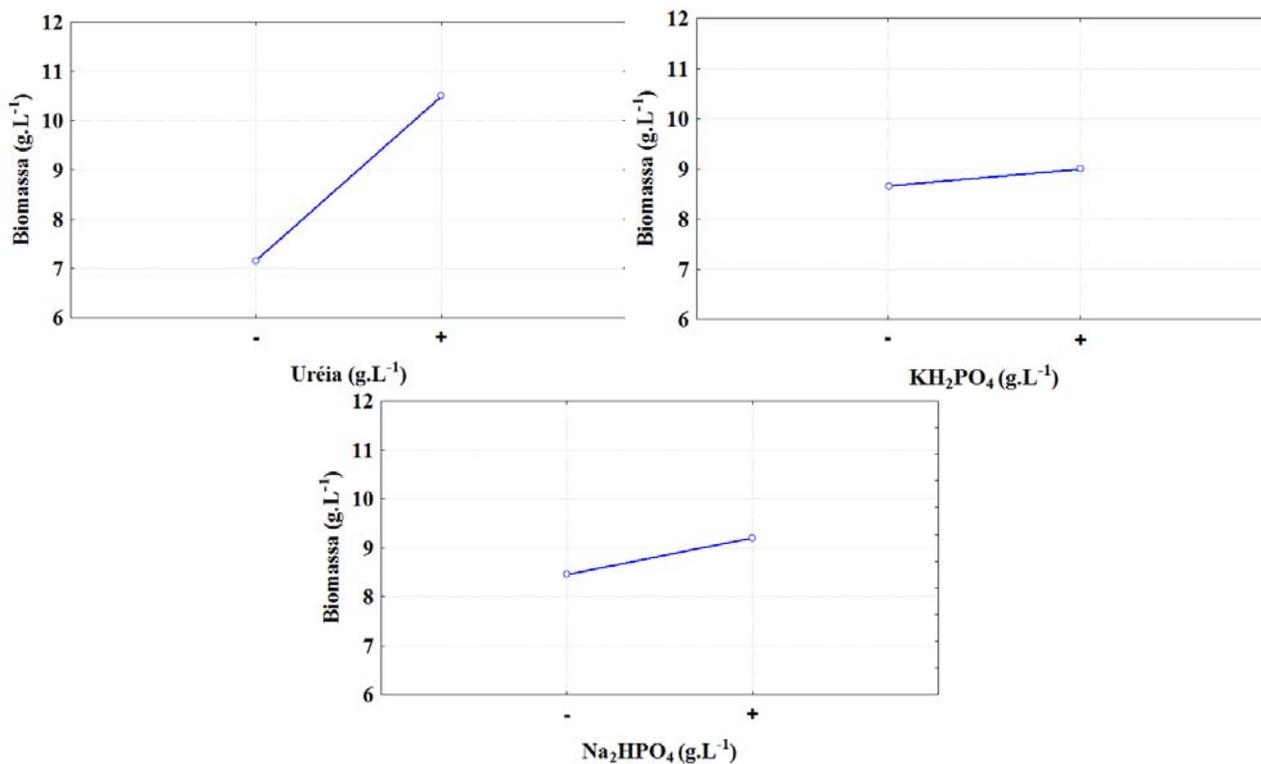


Figura 12 - Gráficos da análise do efeito das concentrações de uréia, KH₂PO₄ e Na₂HPO₄ sobre o crescimento celular de *C. necator*.

A Figura 12 mostra que o fator mais influenciou significativamente na produção de biomassa foi a uréia no nível superior, de 2 g.L⁻¹. As células de *Cupriavidus necator* são compostas principalmente por lipídios, fosfolipídios, peptoglicano e material protéico (PUNRATTANASIN, 2001). Como o nitrogênio é essencial à formação dos aminoácidos que compõe as proteínas, em maior concentração de uréia, houve maior crescimento celular bacteriano.

Pode-se observar ainda, que as maiores concentrações de biomassa foram alcançadas também em consequência das maiores concentrações de KH₂PO₄ e Na₂HPO₄ empregadas.

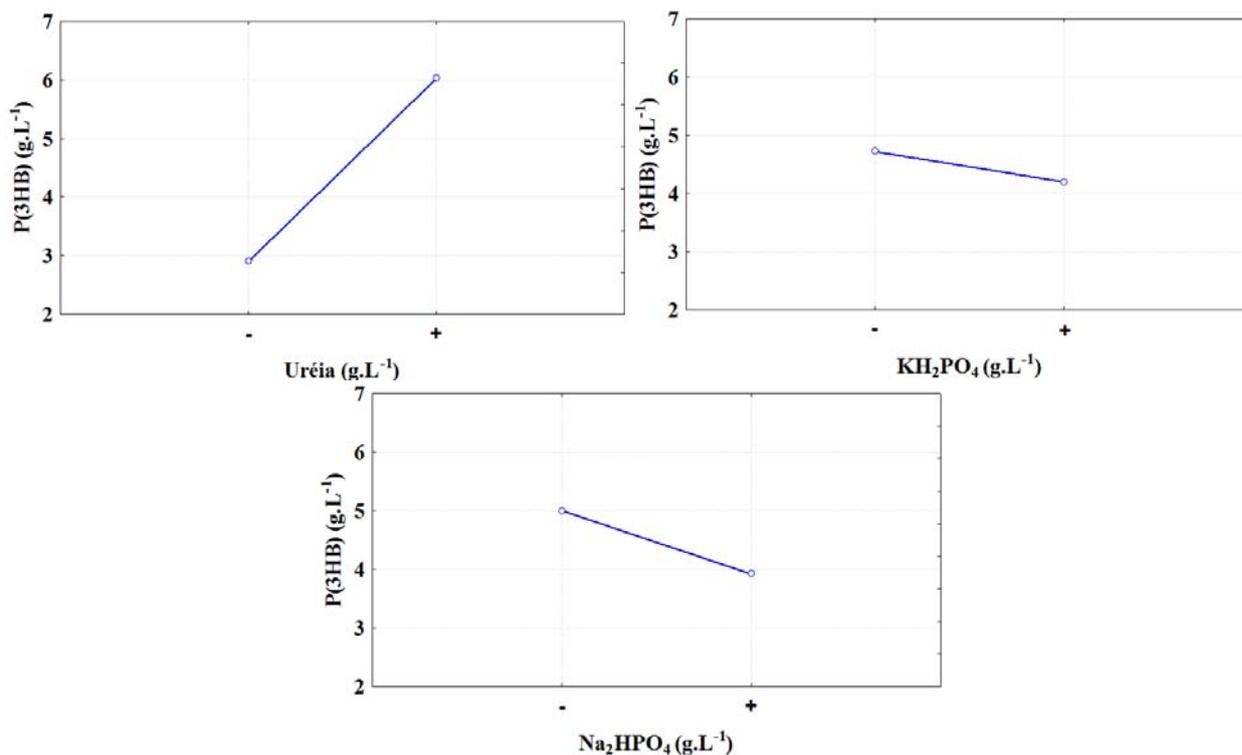


Figura 13 - Gráficos da análise do efeito das concentrações de uréia, KH_2PO_4 e Na_2HPO_4 sobre o acúmulo de P(3HB) por *C. necator*.

Através da Figura 13 pode-se observar que o fator que mais influenciou na produção de P(3HB) foi a fonte de nitrogênio. Na maior concentração de uréia (2 g.L^{-1}), a conversão de substrato em polímero foi maior. Yeo et al. (2008) observaram que concentrações maiores da fonte de nitrogênio resultam em elevados níveis de ATP e NADPH os quais aumentam a taxa biossintese de P(3HB).

O inverso ocorreu com os fosfatos, pois o acúmulo de polímero foi maior nos níveis inferiores de KH_2PO_4 e Na_2HPO_4 , que foram $1,5$ e $0,6 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Isto indica que em menor concentração, a limitação destes nutrientes foi mais rápida, favorecendo as condições para que a bactéria sintetizasse o P(3HB).

4.3 Avaliação de diferentes condições de tratamento térmico

Como o tratamento térmico é uma etapa importante no processo de extração do polímero já que desestabiliza a parede celular da bactéria, neste experimento analisou-se diferentes condições de pré-tratamento sobre a recuperação de P(3HB-co-3HV) para avaliar se é possível obter altos rendimentos de extração em tratamentos térmicos mais brandos.

Os diferentes tratamentos térmicos testados foram realizados durante 15 min. Os pré-tratamentos a 100°C e 121°C foram realizados em autoclave e o ensaio a 80°C foi conduzido em banho térmico.

As células utilizadas neste experimento apresentavam 75% de polímero, que foi extraído com a enzima Celumax[®] BC na concentração de 0,02%. A recuperação do polímero foi alcançada com 1 mL de clorofórmio.

A Tabela 17 apresenta a porcentagem de P(3HB-*co*-3HV) extraído com as diferentes condições de tratamento térmico.

Tabela 17 - Porcentagem média de P(3HB-*co*-3HV) recuperado nas diferentes temperaturas.

Ensaio	T (°C)	% P(3HB- <i>co</i> -3HV)
1	121	94,1±0,7 ^a
2	100	83,8±0,8 ^b
3	80	79,5±0,5 ^c

O tratamento térmico é realizado a fim de que a enzima ataque a membrana externa das células para ter acesso ao peptoglicano, que é um polímero insolúvel constituinte das paredes celulares bacterianas (PELCZAR et al., 1996), e com isso, deixar a estrutura mais rígida da parede celular suscetível ao ataque de enzimas.

Conforme mostrado na Tabela 17, a condição que mais se destacou estatisticamente foi o tratamento a 121°C onde a porcentagem de extração de P(3HB-*co*-3HV) foi de 94,1%. Isto indica que, a maior temperatura, contribui para a desestabilização da parede celular de *Cupriavidus necator*.

Nos ensaios a 80 e 100°C, a recuperação de polímero foi significativamente menor em relação ao ensaio 1. Com isto, conclui-se que o pré-tratamento a 121°C por 15 min, auxilia na atuação da enzima Celumax[®] BC aumentando a liberação do polímero para o meio de onde será extraído.

Em estudos sobre utilização de enzimas para recuperação de P(3HB) produzido por *C. necator*, Kapritchkoff et al. (2006) realizam um pré-tratamento das células a 85°C durante 15 min. Segundo os autores, o tratamento térmico desnatura o material genético e as proteínas, desestabilizando a parede celular da bactéria, tornando-a mais sensível à ação das enzimas.

A principal enzima para a degradação de P(3HB) e oligômeros derivados de polímeros é a PHB despolimerase (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005a). De acordo com Steinbüchel et al. (1996), o pré-tratamento das células com altas temperaturas é favorável ao processo final de recuperação do polímero já que desnatura a enzima PHB despolimerase.

4.4 Influência do tipo de solvente e tempo de hidrólise sobre a extração de P(3HB)

As células utilizadas neste experimento foram cultivadas em biorreator de 5 L e o teor de P(3HB) no interior das células medido por cromatografia gasosa foi de 72%.

O uso de solventes na recuperação de biopolímeros é um processo simples já que envolve apenas três etapas: pré-tratamento da biomassa, extração com solvente e purificação do polímero (JIANG et al.,

2006). Foram adicionados aos tubos referentes aos ensaios 1, 4 e 7, 1 mL de clorofórmio, nos experimentos 3, 6 e 9, 1 mL de diclorometano e nos ensaios 2, 5 e 8, 1 mL de álcool citrus. Todas as extrações foram realizadas em triplicata.

A Tabela 18 apresenta a porcentagem média de P(3HB) extraído com a respectiva análise estatística para os ensaios realizados com diferente solventes e tempos de hidrólise.

Tabela 18 - Porcentagem média de P(3HB) obtida após a extração com diferentes solventes e tempos de hidrólise com a enzima Alcalase[®] 2.4L.

Ensaio	Condições	% Média de P(3HB)
1	Branco 3 h clorofórmio	39,1±0,3 ^a
2	Branco 3 h álcool citrus	0,7±0,1 ^b
3	Branco 3 h diclorometano	3,9±0,1 ^c
4	Enzima 1,5 h clorofórmio	82,8±0,2 ^d
5	Enzima 1,5 h álcool citrus	1,5±0,1 ^{be}
6	Enzima 1,5 h diclorometano	6,8±0,1 ^f
7	Enzima 3 h clorofórmio	84,8±0,3 ^g
8	Enzima 3 h álcool citrus	1,6±0,1 ^e
9	Enzima 3 h diclorometano	7,0±0,2 ^f

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey HSD, ($p \geq 0,05$).

Os ensaios brancos neste experimento foram removidos no tempo de 3 h e nas extrações com auxílio de enzimas, os frascos foram agitados durante 1,5 e 3 h.

Baseado nos resultados de Marchessault e Terada (1999) escolheu-se o clorofórmio e diclorometano para a extração do P(3HB) pelo fato de que o polímero apresenta boa solubilidade nestes dois solventes, além do álcool citrus que foi avaliado devido ao fato de apresentar baixo custo.

O método de separação do solvente é um fator importante para as características finais do filme. Dalcanton (2006) avaliou a evaporação do solvente contendo P(3HB) em placa de Petri exposta a condições ambiente e em placa de Petri colocada em uma cuba de vidro totalmente fechada com saturação do meio em clorofórmio e observou que o filme obtido em condições não controladas apresentou característica rugosa, já que o solvente evaporou rapidamente, enquanto que o filme obtido em meio saturado com clorofórmio ficou mais liso. Por esta razão, a evaporação do solvente em cuba fechada com saturação foi utilizada neste trabalho.

A enzima Alcalase[®] 2.4L foi utilizada nestes ensaios por ter ampla aplicação em diversos processos biotecnológicos. Como pode-se observar na Tabela 18, nos ensaios brancos, sem adição de enzima, a porcentagem de biofilme recuperado foi inferior aos experimentos onde a Alcalase[®] 2.4L foi adicionada. Isto ocorreu porque sem a enzima proteolítica, não houve a lise da parede celular de *C. necator*, portanto, a permeabilidade do P(3HB) para o exterior da célula foi menor.

Já nos ensaios onde a enzima foi acrescentada, a recuperação do biofilme foi maior, pois a enzima hidrolisou as estruturas da parede celular do microrganismo. Pode-se observar ainda, que quanto maior o

tempo de exposição das células à ação da enzima, maior é a recuperação. Entretanto não houve diferença significativa nos resultados entre os dois tempos de hidrólise para o álcool citrus e diclorometano. Com o uso do clorofórmio, a porcentagem de extração nos dois tempos foi estatisticamente diferente, porém pequena. Com isso, para os ensaios posteriores, adotou-se o período de 1,5 h de exposição ao banho térmico. Do ponto de vista econômico, este resultado é positivo já que o consumo de energia durante a hidrólise enzimática é um fator que pode tornar inviável o processo de recuperação do polímero.

Em relação aos solventes, nos ensaios onde a extração foi realizada com clorofórmio, a recuperação foi superior, chegando a 84,8% no experimento 7, onde o tempo de exposição ao banho agitado foi de 3 h. Nestes testes, o filme obtido formou película uniforme.

Nos ensaios com recuperação do polímero através do diclorometano, o P(3HB) extraído formou um filme visível ao fundo da placa, porém, no centro não havia formação da película. Isto ocorreu porque, com este solvente, obteve-se uma recuperação de, no máximo, 7,0% de biofilme.

Nas extrações realizadas com álcool citrus, houve uma pequena recuperação. Nestes ensaios não foi possível observar a formação de filme de P(3HB) no recipiente, pois álcoois de cadeia curta como metanol e etanol, principais constituintes do álcool citrus, não possibilitam uma boa extração do polímero.

Ramsay et al. (1994) avaliaram a recuperação de poli(β -hidroxibutirato) através de três diferentes solventes clorados. Após o pré-tratamento da biomassa com acetona, foram realizadas as extrações dos polímeros com clorofórmio, cloreto de metileno, e 1,2-dicloroetano onde a recuperação foi de 70, 24, e 66% e o grau de pureza para os três solventes foi de 96, 95 e 93%, respectivamente.

Os dados destes ensaios demonstram que a combinação do uso de enzimas, para lise celular, e clorofórmio, como solvente de extração, é uma estratégia eficiente para recuperação de P(3HB).

4.5 Extração de P(3HB) após hidrólise enzimática com diferentes tipos de enzimas

A biomassa utilizada para extração com diferentes tipos de enzimas foi a mesma do experimento anterior que apresentava 72% de P(3HB).

Devido a problemas gerados pelo uso de produtos químicos, neste trabalho, avalia-se a eficiência de enzimas na lise da parede celular da bactéria *C. necator* por serem catalisadores naturais, com alta especificidade e que aceleram reações sem participar como reagentes ou produtos.

A Tabela 19 apresenta a porcentagem média de P(3HB) e também a análise estatística das médias obtidas para recuperação após as extrações realizadas com diferentes enzimas.

Tabela 19 - Porcentagem média de P(3HB) recuperado e análise estatística obtida após a extração com diferentes tipos de enzimas.

Ensaio	Enzima	% Média de P(3HB)
1	Celumax [®] BC	87,6±0,4 ^a
2	Corolase [®] L10	85,0±0,2 ^b
3	Rohament [®] CL	84,1±0,3 ^{bc}
4	Alcalase [®] 2.4L	83,1±0,1 ^c
5	Rohalase [®] Barley	73,8±0,2 ^d
6	Corolase [®] 7089	66,4±0,3 ^e
7	Protemax [®] FC	51,9±0,1 ^f
8	Corolase PP [®]	41,8±0,1 ^g
9	Rohalase [®] BX	40,5±0,4 ^h

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey HSD, ($p \geq 0,05$).

Suzuki et al., (2008) realizaram a purificação de biopolímeros produzidos por *Burkholderia cepacia* IPT64 através de ataque químico e enzimático. Usando apenas o ataque químico com dodecil sulfato de sódio (SDS), o grau de pureza do polímero foi de 57%. Quando realizado pré-tratamento enzimático com a protease Esperase 8L[®] na proporção de 2% (enzima/célula) seguido de adição de SDS, a pureza aumentou para 71%.

Através do teste de Tukey foi possível verificar com os resultados obtidos por meio das médias entre as duplicatas, que três enzimas testadas para extração do P(3HB) se destacaram: Celumax[®] BC, Corolase[®] L10 e Rohament[®] CL.

Pela análise estatística dos dados apresentados na Tabela 19, observa-se que, com um nível de significância de 5%, não houve diferença significativa entre extrações realizadas com as enzimas Corolase[®] L10 e Rohament[®] CL e também entre Rohament[®] CL e Alcalase[®] 2.4L.

O maior rendimento, de 87,6%, foi obtido com a enzima Celumax[®] BC que é um sistema de enzimas à base de mananase, celulase e hemicelulase geralmente aplicado na degradação de substâncias derivadas da parede celular de plantas.

Com a papaína Corolase[®] L10, obteve-se uma extração significativa de 85% de polímero. Ryan e Ward (1988) verificaram que a enzima β -1,3 glucanase de *Basidiomycete aphylophoroles* possui alta atividade lítica em leveduras, entretanto, quando utilizada em combinação com papaína, a solubilização das leveduras chega a 95% da massa seca.

A enzima Rohament[®] CL é obtida a partir do fungo filamentosos *Trichoderma reesei* e degrada celulose formando outros oligolissacarídeos. A extração do biopolímero com esta celulase foi expressiva chegando a 84,1% de P(3HB) recuperado.

Alcalase[®] 2.4L é uma enzima utilizada em muitos processos de extração. Santos e Ferrari (2005) utilizaram a protease Alcalase e uma celulase para extração aquosa enzimática de óleo de soja e das duas enzimas utilizadas, a protease apresentou melhor eficiência na extração. Entretanto, na lise da parede

celular da *C. necator*, observa-se que a Alcalase[®] 2.4L proporcionou uma extração estatisticamente menor (83,1%) do que a enzima a base de celulase (Celumax[®] BC).

Rohalase[®] Barley contém predominantemente a enzima β -glucanase, além de celulase e de endoxilânase, entretanto, a sua eficiência quanto à extração de P(3HB) não foi tão significativa (73,8%) quanto a Celumax[®] BC.

Apesar da Corolase[®] 7089 ser uma enzima versátil, capaz de hidrolisar proteínas provenientes de diversas fontes como as do leite, peixes e glúten de trigo, a sua atuação sobre a parede celular da *C. necator* foi menor (66,4%).

Das nove enzimas avaliadas, Protemax[®] FC, Corolase PP[®] e Rohalase[®] BX não realizaram uma eficiente lise das células da bactéria, levando a baixas extrações de P(3HB), 51,9, 41,8 e 40,5%, respectivamente. Rohalase[®] BX promove maior lise em células de leveduras, segundo Medeiros et al. (2008), a ruptura da parede celular das leveduras em geral é mais fácil do que das bactérias devido ao maior tamanho e à diferença na estrutura da membrana celular.

Para comprovar estes resultados e confirmar qual a melhor enzima, o ensaio foi repetido com as enzimas Celumax[®] BC, Corolase[®] L10, Rohament[®] CL e Alcalase[®] 2.4L.

Como as extrações com as nove enzimas foram realizadas em tubos *ependorf* que apresentam volume útil de 2 mL onde a manipulação de amostras e materiais é mais difícil, as extrações no experimento seguinte foram realizadas em tubos de centrífuga com volume de 50 mL. A Tabela 20 apresenta as porcentagens médias de polímero extraído e a análise estatística dos resultados.

Tabela 20 - Porcentagem média de P(3HB) e análise estatística das extrações realizadas com as enzimas Celumax[®] BC, Corolase[®] L10, Rohament[®] CL e Alcalase[®] 2.4L.

Ensaio	Enzima	% Média de P(3HB)
1	Celumax [®] BC	88,1±0,4 ^a
2	Corolase [®] L10	85,6±0,1 ^b
3	Rohament [®] CL	84,8±0,3 ^{bc}
4	Alcalase [®] 2.4L	84,1±0,3 ^c

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey HSD, ($p \geq 0,05$).

Este experimento confirmou os resultados do ensaio representado na Tabela 20, indicando que apesar dos tubos *ependorf* apresentarem volume útil pequeno, os resultados gerados são confiáveis num nível de significância de 5%.

O uso de enzimas é um processo atrativo, pois promove maior extração do P(3HB) das células de *Cupriavidus necator*. Kapritchkoff et al. (2006) avaliaram a eficiência de diferentes enzimas (papaína, bromelina, tripsina bovina, quimiotripsina bovina, lisozima e celulase) na recuperação de P(3HB) sintetizado por *C. necator*. Os melhores resultados, obtidos por estes pesquisadores, em termos de quantidade de enzima utilizada por gramas de P(3HB) recuperado, foram com a bromelina.

Nos resultados apresentados na Tabela 20, a maior extração, de 88,1%, foi obtida com a enzima Celumax[®] BC e isto pode estar atribuído a sua constituição, já que é um composto enzimático formado principalmente por celulase.

Com a enzima a base de papaína, Corolase[®] L10, a quantidade de polímero recuperado também foi significativa, chegando a 85,6%. Shumann e Müller (2006) utilizaram a papaína para auxiliar na extração de PHB. Após a lavagem da biomassa, 0,2% da enzima foi adicionada ao meio contendo as células e esta suspensão permaneceu a 60°C durante 2 h. Ao final da operação, os autores obtiveram uma extração com um rendimento de 95% de polímero.

Apesar da Rohament[®] CL apresentar em sua composição a enzima celulase, assim como Celumax[®] BC, o teor de biofilme obtido foi menor (84,8%). Segundo o fornecedor, enzimas do gênero Rohament são utilizadas para a preparação de concentrados de frutas. Bastos et al. (2002) utilizaram a enzima Rohament[®] PL na extração de polpa de cupuaçu. Nos ensaios controle, sem adição da enzima, o rendimento foi de 41% enquanto que no ensaio com adição de enzima, nas mesmas condições, a extração aumentou para 57%. Isto demonstra que as enzimas realizam reações específicas auxiliando na lise da parede celular tanto de frutas e vegetais quanto de microrganismos como bactérias.

Com a Alcalase[®] 2.4L, a extração do P(3HB) foi de 84,1%. Yasotha et al. (2006) avaliaram a influência dos fatores como concentração de Alcalase, SDS e EDTA na extração de PHA sintetizado por *Pseudomonas putida*. O planejamento fatorial realizado pelos autores mostrou que a Alcalase contribuiu com 71,5% na extração do polímero enquanto os outros fatores não foram tão significantes.

A enzima Celumax[®] BC foi selecionada para a extração de P(3HB) nos experimentos seguintes por apresentar maior eficiência na lise da parede celular bacteriana conforme os resultados apresentados nas Tabelas 19 e 20. Estes dados mostram que o uso de enzimas é um processo eficiente, não havendo a necessidade do uso de componentes químicos para auxiliar no rompimento das células de *Cupriavidus necator*.

4.6 Otimização das condições para atividade da enzima Celumax[®] BC

A busca por condições ótimas de hidrólise enzimática (pH, temperatura, concentração de enzima e tempo de hidrólise) foi realizada para aumentar a eficiência da enzima na lise celular da bactéria *Cupriavidus necator* aumentando assim, a recuperação de polímero.

Os níveis da concentração de enzima, pH e temperatura foram escolhidos de acordo com os valores ótimos para a enzima Celumax[®] BC cedidos pelo fornecedor. Variou-se o tempo de exposição das suspensões ao banho térmico em função de experimentos anteriores sobre a influência do tempo de hidrólise na extração de P(3HB) realizados com a enzima Alcalase[®] 2.4L (item 4.5).

Nestes experimentos, avaliou-se a recuperação do copolímero P(3HB-co-3HV) que é sintetizado por *C. necator* quando alimentado com fonte de carbono e co-substratos como o ácido propiônico

(BYROM, 1987). As células continham 75% de P(3HB-co-3HV) e o polímero apresentava 79% de unidades 3HB e 21% de 3HV.

A Tabela 21 apresenta a porcentagem média de P(3HB-co-3HV) extraído e as variáveis do primeiro planejamento fatorial de otimização das condições para a enzima Celumax[®] BC.

Tabela 21 - Dados do planejamento fatorial para otimização das condições de operação da enzima Celumax[®] BC e porcentagem média de P(3HB-co-3HV) recuperado.

Ensaio	pH	T(°C)	[E] (%) (p/p)	t (h)	% P(3HB-co-3HV)
1	(-) 4	(-) 60	(-) 0,02	(-) 1	93,2±0,5 ^a
2	(+) 4,5	(-) 60	(-) 0,02	(+) 1,5	86,8±0,4 ^b
3	(-) 4	(+) 70	(-) 0,02	(+) 1,5	90,4±0,8 ^{cd}
4	(+) 4,5	(+) 70	(-) 0,02	(-) 1	87,4±0,7 ^{be}
5	(-) 4	(-) 60	(+) 0,1	(+) 1,5	88,7±0,4 ^{bd}
6	(+) 4,5	(-) 60	(+) 0,1	(-) 1	89,4±0,5 ^{de}
7	(-) 4	(+) 70	(+) 0,1	(-) 1	92,1±0,7 ^{ac}
8	(+) 4,5	(+) 70	(+) 0,1	(+) 1,5	86,3±0,7 ^b

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey HSD, ($p \geq 0,05$).

As condições controladas de pH, temperatura, concentração de enzima e tempo contribuíram para o enfraquecimento da parede celular e os grânulos de P(3HB-co-3HV) foram liberados na solução tamponada para serem extraídos.

Observa-se que a enzima Celumax[®] BC atacou a camada de peptidoglicano, resultando na alteração da pressão osmótica interna e rompendo a parede celular da bactéria o que também foi observado por Rattedge e Kristiansen (2001). Com os resultados obtidos por meio das médias entre as triplicatas, pode ser verificado, na Tabela 21, que as condições avaliadas no ensaio 1 se destacaram na recuperação do polímero. Neste ensaio, todos os parâmetros foram testados no nível inferior e obteve-se 93,2% de P(3HB-co-3HV) com 94% de pureza.

Em estudos realizados por Hahn et al. (1995), o hipoclorito de sódio foi empregado na recuperação de P(3HB) sintetizado por *C. necator* em meio de cultura contendo glicose como fonte de carbono. Ao final da fermentação, o conteúdo de polímero no interior das células era de 62% e, após o tratamento com a solução de hipoclorito de sódio, o nível de pureza do filme obtido foi de 86%. Além da pureza obtida no ensaio 1 ser maior do que a reportada pelos autores, a utilização de enzimas no processo de recuperação é mais vantajosa já que a digestão com hipoclorito de sódio resulta em polímero de baixa massa molar.

No ensaio 8, onde todos os parâmetros foram avaliados no nível superior, a recuperação de P(3HB-co-3HV) foi significativamente menor (86,3%) quando comparada ao ensaio 1. Estes resultados são positivos em relação aos custos de recuperação, já que a maior extração foi obtida no primeiro ensaio, com a menor concentração de enzima (0,02%), temperatura mais baixa (60°C) e menor tempo de exposição ao calor (1 h).

A análise entre os ensaios 1 e 7, mostrou que não houve diferença significativa na porcentagem de copolímero extraído. Estes experimentos diferiam na temperatura do banho e na concentração de enzima. Isto indica que, apesar de no ensaio 1 se ter adicionado uma concentração de Celumax[®] BC cinco vezes menor, esta foi suficiente para provocar a lise da parede celular da bactéria com eficiência.

Pode-se observar ainda, que nos ensaios intermediários entre 1 e 8, a maior parte dos valores de rendimento de P(3HB-co-3HV) extraído não diferiram estatisticamente, com um nível de significância de 5%, reforçando a conclusão de que as melhores condições para se obter uma maior recuperação de polímero encontram-se nos níveis inferiores.

Com os resultados expressos na Tabela 21 e utilizando o programa Statistica, obteve-se os gráficos de efeito para cada parâmetro (pH, temperatura, concentração de enzima e tempo) sobre a recuperação de P(3HB-co-3HV). Com estes dados é possível determinar quais parâmetros realmente apresentam influência estatística significativa, e isso pode ser observado por meio da Figura 14.

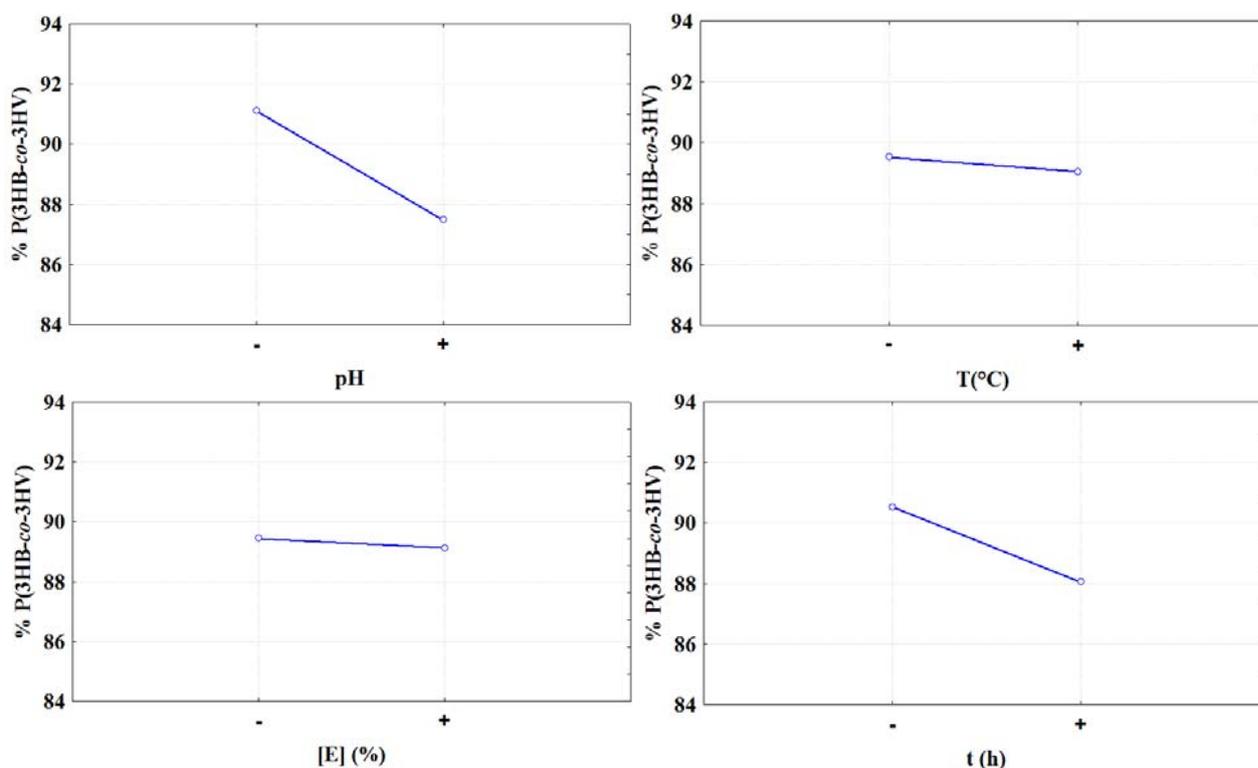


Figura 14 - Análise dos efeitos dos parâmetros pH, temperatura (T), concentração de enzima ([E]) e tempo (t) sobre a extração de P(3HB-co-3HV).

A estabilidade das enzimas é um dos fatores de maior importância na indústria devido ao fato de algumas serem instáveis em determinadas condições de pH e temperatura do processamento, tornando-se rapidamente inativas (SEGEL, 1993). Como pode-se observar na Figura 14, o parâmetro que mais influenciou na extração do polímero foi o pH e sua melhor condição apresentou-se no nível inferior (4,0).

A temperatura é outro fator que influencia na atividade enzimática. A termoestabilidade da enzima depende da temperatura ótima do meio em que se encontra. Como mostrado na Figura 14, o nível inferior

(60°C) influenciou positivamente sobre o rendimento da extração de P(3HB-co-3HV). Isto ocorreu conforme o esperado, já que este valor foi o ótimo recomendado pelo fornecedor.

Segundo indicações da Prozyn BioSolutions, a concentração ideal de Celumax[®] BC deve ser obtida através de testes práticos, pois varia de acordo com o processo e a qualidade da matéria-prima. A empresa recomenda a concentração de 0,02 a 0,1% em base de substrato seco. Estes dois valores foram testados e com o teor de 0,02% de enzima obteve-se a maior recuperação de P(3HB-co-3HV), de 93,2%.

O tempo de exposição das células durante a hidrólise enzimática teve grande participação na recuperação do copolímero. O menor tempo (1 h) foi suficiente para que ocorresse a lise das células.

As condições de extração têm um grande impacto sobre a degradação dos PHA's durante o processo de recuperação (RAMSAY et al., 1994). Portanto, é importante otimizar essas condições para que o polímero recuperado apresente características apropriadas para produção em maior escala.

Com os resultados obtidos para extração de P(3HB-co-3HV) no primeiro planejamento fatorial, foram realizadas novas variações em algumas condições do método de hidrólise enzimática. A temperatura do banho agitado foi mantida a 60°C e o tempo de exposição ao banho foi de 1 h. Novamente, analisou-se a concentração enzimática, e como o parâmetro mais importante foi o pH, neste novo experimento seu efeito foi observado em diferentes níveis. Também avaliou-se a influência do tratamento térmico a 121°C durante 15 min, realizado anteriormente à hidrólise, sobre a recuperação de P(3HB-co-3HV). A Tabela 22 apresenta os resultados do segundo planejamento fatorial de otimização das condições de operação da enzima Celumax[®] BC.

Tabela 22 - Dados do segundo planejamento fatorial para otimização das condições de operação da enzima Celumax[®] BC e porcentagem média de P(3HB-co-3HV) recuperado.

Ensaio	pH	[E] (%) (p/p)	T T	% P(3HB-co-3HV)
1	(-) 4	(-) 0,01	(-) sem	61,2±0,4 ^a
2	(+) 4,2	(-) 0,01	(-) sem	60,7±0,5 ^a
3	(-) 4	(+) 0,02	(-) sem	67,8±0,5 ^b
4	(+) 4,2	(+) 0,02	(-) sem	65,3±0,7 ^c
5	(-) 4	(-) 0,01	(+) com	90,9±0,4 ^d
6	(+) 4,2	(-) 0,01	(+) com	90,3±0,7 ^d
7	(-) 4	(+) 0,02	(+) com	94,5±0,6 ^e
8	(+) 4,2	(+) 0,02	(+) com	93,8±0,4 ^e

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey HSD, (p≥0,05).

A análise dos resultados mostrou que, ao nível de significância de 5%, nos ensaios onde o tratamento térmico não foi previamente realizado, a extração de P(3HB-co-3HV) foi estatisticamente menor, enquanto que nos ensaios onde as células foram tratadas em autoclave a 121°C por 15 min, a recuperação chegou a 94,5% (ensaio 7). Neste ensaio, o filme obtido apresentou 91% de pureza.

Dalcanton (2006) baseou-se na técnica de Hahn et al. (1994) que utiliza clorofórmio e solução de hipoclorito de sódio 30% para extrair P(3HB) intracelular da bactéria *C. necator*. Com este método, a

recuperação foi de 94% e o filme obtido apresentou 98% de pureza. Apesar de o autor ter obtido maior pureza, a porcentagem de extração foi similar ao encontrado no ensaio 7. A digestão enzimática apresenta vantagem sobre os métodos químicos pelo fato das enzimas serem compostos orgânicos naturais enquanto que os produtos químicos causam problemas durante o tratamento de efluentes.

Os resultados mostram ainda, que não houve diferença significativa na porcentagem de P(3HB-co-3HV) extraído entre os ensaios 5 e 6 e também entre 7 e 8. Como apresentado na Tabela 22, os experimentos diferiram apenas no pH do meio, o que indica que esta variável não influenciou significativamente na extração do biopolímero.

Na literatura são reportados diferentes processos para recuperar PHA's. Garcia (2006) propôs um método mecânico alternativo para a extração do P(3HB) produzido por *Cupriavidus necator* que utiliza pérolas de vidro em um moinho de bolas para a ruptura celular. O autor estudou o efeito das diferentes condições de extração como volume de células além da massa e diâmetro das pérolas, obtendo um rendimento máximo de extração de 83,8% de P(3HB). Apesar de este método ser uma alternativa menos impactante para o ambiente, a recuperação do polímero ainda é pequena quando comparada ao método que utiliza tratamento térmico das células seguido de digestão enzimática.

A Figura 15 apresenta os gráficos de análise do efeito dos parâmetros avaliados.

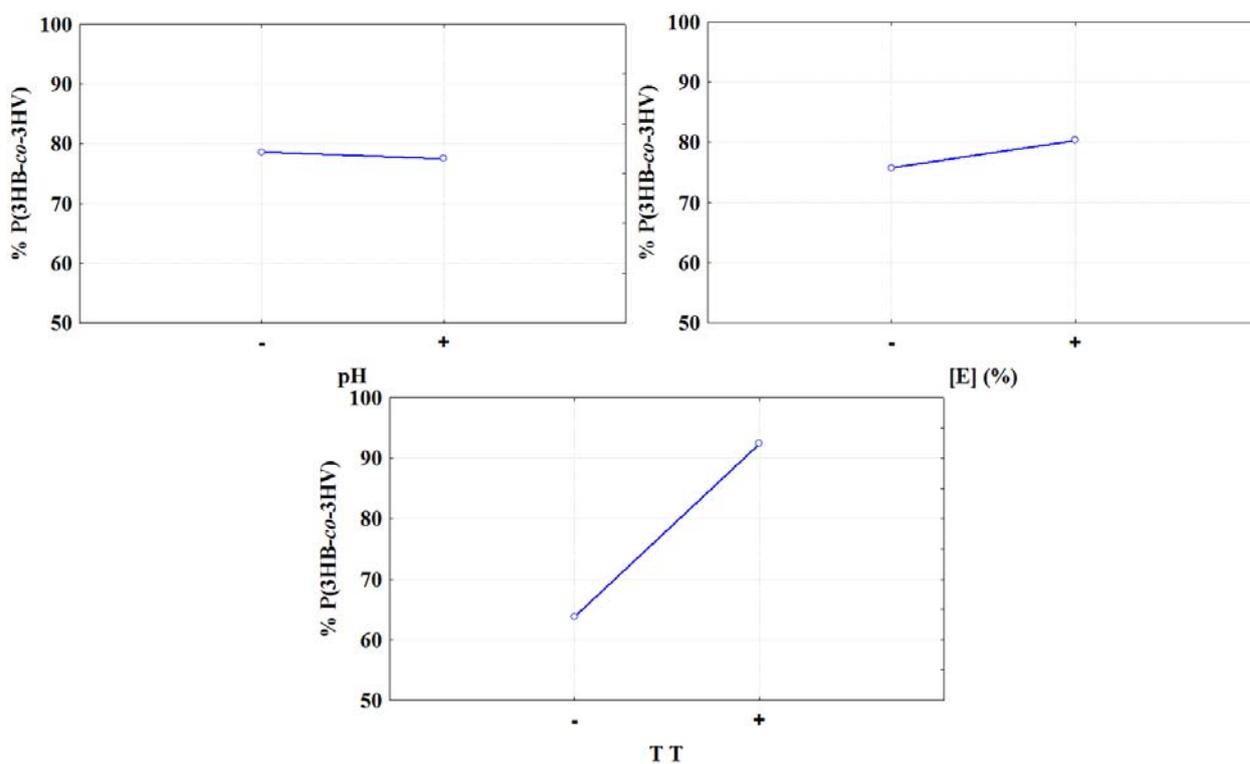


Figura 15 - Análise do efeito dos parâmetros pH, concentração de enzima ([E]) e tratamento térmico (T T) sobre a extração de P(3HB-co-3HV).

Na Figura 15 pode-se verificar que o pH não apresentou grande influência no processo de otimização das condições de operação da enzima Celumax[®] BC, entretanto, em pH no nível inferior (4,0),

houve uma maior recuperação de polímero. Este resultado confirma o dado cedido pelo fornecedor, de que o pH 4,0 é ótimo para operação da enzima.

Quanto mais enzima utilizada durante a hidrólise, maior é a degradação e solubilização do material celular. Como observado na Figura 15, com a maior concentração enzimática (0,02%) obteve-se extrações de P(3HB-*co*-3HV) mais elevadas.

A análise do efeito do tratamento térmico sobre a extração de polímero foi realizada a fim de verificar se há a necessidade de autoclavar os meios antes da hidrólise enzimática. Das três variáveis testadas, a que mais influenciou significativamente no processo de extração do P(3HB-*co*-3HV) foi o tratamento térmico. A combinação de alta pressão e temperatura contribuiu para o enfraquecimento da parede celular bacteriana, tornando-a mais suscetível ao ataque enzimático, aumentando assim, a recuperação de biopolímero.

Harrison et al. (1991) relataram a lise completa das células de *C. necator* após tratamento com pH de 7,3 a 37,5°C durante 1 h com enzimas líticas de *Cytophaga* sp.

4.7 Análise de custos com enzimas

Em um processo de obtenção de P(3HB), as etapas de recuperação e purificação do polímero são importantes no que diz respeito aos custos de produção (de KONING et al., 1997). O método de extração de P(3HB) proposto neste trabalho envolveu diferentes tipos de enzimas, portanto se faz necessário a análise de custos para avaliar se a utilização da enzima Celumax[®] BC é atrativa do ponto de vista econômico. A Tabela 23 apresenta o preço do quilo e a recuperação de polímero para cada enzima testada no processo de hidrólise enzimática.

Tabela 23 - Preço e recuperação de P(3HB) das enzimas.

Enzima	Empresa	Preço enzima US\$/Kg*	% P(3HB)
Celumax [®] BC	Prozyn BioSolutions	100,55	94,5
Corolase [®] L10	AB Enzymes	13,81	85,0
Rohament [®] CL	AB Enzymes	17,14	84,1
Alcalase [®] 2.4L	Novozymes	-	83,1
Rohalase [®] Barley	AB Enzymes	13,81	73,8
Corolase [®] 7089	AB Enzymes	17,87	66,4
Protemax [®] FC	Prozyn BioSolutions	193,28	51,9
Corolase PP [®]	AB Enzymes	146,25	41,8
Rohalase [®] BX	AB Enzymes	169,48	40,5

*Preços fornecidos pelos fabricantes em 17/01/2009.

Pode-se observar na Tabela 23 que, no experimento realizado com diferentes enzimas para extração de P(3HB), se extraiu 85% de polímero com 0,5% (p/p) de Corolase[®] L10. Já com os

planejamentos fatoriais de otimização das condições de operação de Celumax[®] BC, obteve-se até 94,5% de recuperação com 0,02% (p/p) da enzima. Como Celumax[®] BC é aproximadamente 7,3 vezes mais onerosa do que a papaína Corolase[®] L10, foram realizados testes para avaliar se a papaína exerce boa atuação em dosagens mais baixas.

As suspensões com 2% (p/v) de células foram preparadas em tampões acetato com pH 4,0 e 5,5 para as enzimas Celumax[®] BC e Corolase[®] L10, respectivamente. No primeiro ensaio, adicionou-se à solução de células em tampão, 0,02% (p/p) de Celumax[®] BC nos demais testes, a concentração de Corolase[®] L10 variou entre 0,02 e 0,5% em base de biomassa seca.

A biomassa utilizada para extração com diferentes concentrações de enzimas apresentava 72% de P(3HB).

A Tabela 24 apresenta os resultados das extrações realizadas com diferentes concentrações de enzimas.

Tabela 24 - Porcentagens de extração com diferentes concentrações de enzimas.

Ensaio	Enzima	% Enzima (p/p)	% P(3HB)
1	Celumax [®] BC	0,02	93,9±0,7 ^a
2	Corolase [®] L10	0,02	40,2±0,5 ^b
3	Corolase [®] L10	0,05	47,8±0,7 ^c
4	Corolase [®] L10	0,1	63,5±0,6 ^d
5	Corolase [®] L10	0,3	78,9±0,7 ^e
6	Corolase [®] L10	0,5	83,7±0,8 ^f

Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey HSD, ($p \geq 0,05$).

* Ensaio realizado com Celumax[®] BC.

Através dos resultados mostrados na Tabela 24, observa-se que as porcentagens de extração de P(3HB) diferiram significativamente entre todos os ensaios com concentrações de enzimas distintas.

Apesar da concentração de Celumax[®] BC ser pequena, obteve-se alta extração de polímero (93,9%). O mesmo não pôde ser observado com Corolase[®] L10, pois com menores dosagens de enzima, as porcentagens de polímero recuperado foram menores. Isto ocorreu, porque Celumax[®] BC é um pó, enquanto que a papaína é fornecida em meio líquido, com menor concentração de enzima.

Com base nestes dados, realizou-se a análise entre o gasto com enzimas e o retorno financeiro com o P(3HB) extraído com diferentes concentrações de Corolase[®] L10 e 0,02% (p/p) de Celumax[®] BC. Os dados para esta análise podem ser observados na Tabela 25.

Tabela 25 - Retorno financeiro obtido com o P(3HB) extraído com 1 Kg de enzima nos diferentes ensaios.

Enzima	$m_{\text{células}}$	$m_{\text{P(3HB)}}$	$m_{\text{P(3HB) ext.}}$	Ganho _{P(3HB)}	Gasto _{enzima (%)}
Celumax [®] BC 0,02%	5000	3600	3380,4	15211,8	0,6
Corolase [®] L10 0,02%	5000	3600	1447,2	6512,4	0,2
Corolase [®] L10 0,05%	2000	1440	688,3	3097,3	0,4
Corolase [®] L10 0,1%	1000	720	457,2	2057,4	0,7
Corolase [®] L10 0,3%	333	240	189,3	851,8	1,6
Corolase [®] L10 0,5%	200	144	120,5	542,2	2,5

$m_{\text{células}}$ é a massa de células de *C. necator* hidrolisadas com 1 Kg de enzima na concentração adicionada;

$m_{\text{P(3HB)}}$ é a massa de P(3HB) correspondente aos 72% no interior das células;

$m_{\text{P(3HB) ext.}}$ é a massa de polímero extraído de acordo com resultados da Tabela 24;

Ganho_{P(3HB)} é o retorno financeiro obtido com o polímero extraído;

Gasto_{enzima} é o percentual que o custo da enzima representa no ganho com P(3HB).

Massas em Kg e ganhos em US\$.

Os resultados mostrados na Tabela 25 não levam em consideração custos de produção do polímero, como energia, substrato, solvente, entre outros. Os cálculos foram realizados para comparar o retorno financeiro obtido com a utilização de 1 Kg de enzimas nas diferentes concentrações adicionadas. O ganho com P(3HB) foi calculado com base no dado fornecido pela PHB INDUSTRIAL, de que o quilo do polímero é comercializado a US\$ 4,5.

A adição de maiores concentrações de Corolase[®] L10 leva a alta recuperação de polímero já que, com a maior lise das células, mais P(3HB) é liberado no meio tamponado. Entretanto, maiores dosagens da papaína tornam o processo de extração menos viável. Isto ocorreu nos ensaios 5 e 6 onde o gasto com enzimas representou 1,6 e 2,5% do retorno obtido com o polímero, respectivamente.

O retorno obtido com 0,02% (p/p) de Celumax[®] BC (ensaio 1) foi 2,3 vezes maior do que no ensaio 2 realizado com a mesma concentração de Corolase[®] L10. Apesar de a enzima Celumax[®] BC ser 7,3 vezes mais cara que Corolase[®] L10 e o gasto em relação ao retorno ser três vezes maior, a utilização de Celumax[®] BC é mais vantajosa, pois o retorno financeiro obtido com esta enzima é maior. Como o P(3HB) tem alto valor agregado, é mais vantajoso utilizar a enzima mais cara e obter maior rendimento durante a extração do polímero.

4.8 Avaliação do número de extrações de P(3HB) com diclorometano

O diclorometano é amplamente utilizado como solvente, pois é considerado um dos compostos organoclorados menos perigosos, apesar de o seu limiar de aroma (214 ppm) indicar que já se ultrapassou mais de quatro vezes o valor limite de exposição (50 ppm) (ALEEN et al. 1990).

Este experimento foi realizado para quantificar o número de estágios necessários para que a extração com diclorometano seja atrativa em escala industrial.

As células utilizadas nestes ensaios foram obtidas em cultivos em frascos agitados e apresentavam conteúdo de P(3HB) intracelular de 70,4%. A Tabela 26 apresenta os resultados das extrações realizadas com diclorometano.

Tabela 26 - Extrações obtidas com diclorometano.

Ensaio	% P(3HB) solubilizado
1	26,3
2	11,9
3	7,6
4	5,9
5	4,1
Total	54,9

Como mostrado nos resultados anteriores deste trabalho, se alcançou até 94,5% de extração de P(3HB) com o método proposto que utiliza hidrólise enzimática seguida de recuperação do polímero com clorofórmio. Entretanto, pode-se observar através da Tabela 26, que o P(3HB) é menos solúvel no diclorometano quando comparado ao clorofórmio.

Apesar de o diclorometano ser reportado por diversos autores como um solvente alternativo para extração de P(3HB), os resultados mostraram que com cinco extrações com diclorometano na mesma biomassa hidrolisada, se extraiu 54,9% do polímero total intracelular, sendo que, na primeira extração, extraiu-se 26,3% e nos estágios seguintes a recuperação foi diminuindo.

Em escala laboratorial, o uso do diclorometano é muito trabalhoso já que seriam necessárias mais do que cinco extrações para se recuperar a maior parte do polímero. Já em escala industrial, o uso de solventes nos quais o P(3HB) é menos solúvel torna-se possível com a utilização dos equipamentos adequados como, por exemplo, o decantador projetado pela Westfalia Separator que separa o polímero da suspensão resultante da hidrólise enzimática por centrifugação conforme mostrado no item 2.9 na Figura 9.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Os resultados apresentados neste trabalho permitiram concluir que:

- Os cultivos preliminares em frascos agitados indicaram que *Cupriavidus necator* cresce melhor em meio com 40 g.L⁻¹ de glicose, 2 g.L⁻¹ de uréia e 15 mL.L⁻¹ de solução de oligoelementos. Já para produção de P(3HB), o experimento seguinte mostrou que, com 2 g.L⁻¹ de uréia, 1,5 g.L⁻¹ de KH₂PO₄ e 0,6 g.L⁻¹ de Na₂HPO₄ a bactéria acumulou 70,4% de polímero.

- Nos ensaios sem adição de enzima, a recuperação do polímero foi inferior já que não houve a lise da parede celular de *Cupriavidus necator*;

- Em relação aos três solventes testados (álcool citrus, clorofórmio e diclorometano), o clorofórmio possibilitou maior extração de P(3HB) mostrando que o polímero é mais solúvel neste composto;

- Das nove enzimas avaliadas, Celumax[®] BC foi a que melhor provocou a ruptura da parede celular da bactéria, indicando que o uso de enzimas para extração de polímeros é um processo eficiente, não havendo a necessidade de utilizar componentes químicos para auxiliar no rompimento das células de *Cupriavidus necator*;

- Os resultados sobre a otimização das condições de ação de Celumax[®] BC mostraram que: a enzima é mais estável em tampão acetato com pH 4,0 e em banho a 60°C; o tempo de 1 h de hidrólise e a concentração de 0,02% (p/p) proporcionaram a lise da parede celular da bactéria e alta extração de polímero, de 94,5%, com pureza de 91%;

- A avaliação de diferentes condições de tratamento térmico sobre a recuperação de P(3HB-co-3HV) mostrou que o pré-tratamento das células em autoclave a 121°C durante 15 min contribui para a desestabilização da parede celular de *C. necator*, aumentando a extração do copolímero;

- A análise de custos com enzimas mostrou que é mais vantajoso utilizar a enzima Celumax[®] BC pois, apesar dela ser 7,3 vezes mais cara que Corolase[®] L10, se obtém maior rendimento durante a extração do polímero, o qual apresenta alto valor agregado;

- A avaliação do número de extrações de P(3HB) com diclorometano em escala industrial mostrou que, seriam necessárias mais do que cinco extrações para que a utilização do solvente seja atrativa.

Como sugestões, trabalhos posteriores poderiam buscar conhecimento nos seguintes pontos:

- Utilizar enzimas em conjunto para avaliar a eficiência na extração de P(3HB);

- Estudar a influência de diferentes volumes de clorofórmio sobre a extração de polímero tentando minimizar gastos com solvente;

- Buscar novos solventes que sejam eficientes na extração do polímero e menos impactantes para o meio ambiente;

- Realizar a caracterização dos filmes obtidos com as diferentes enzimas e solventes utilizados;

- Avaliar a biodegradabilidade dos filmes obtidos pelo método de digestão enzimática para extração de P(3HB).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALLEN, J.; KLIGERMAN, A.; CAMPBELL, J.; WESTBROOK-COLLINS, B.; EREXSON, G.; KARI, F.; ZEIGER, E. Cytogenetic analyses of mice exposed to dichloromethane. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 15, p. 221-228, 1990.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiological Reviews**, v. 54, n. 4, p. 450-472, 1990.

ANDRADE RODRIGUES, M. F.; VALENTIN, H. E.; BERGER, P. A.; TRAN, M.; ASRAR, J.; GRUYS, K. J.; STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoate accumulation in *Burkholderia* sp.: a molecular approach to elucidate the genes involved in the formation of two homopolymers consisting of short-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 453-460, 2000.

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

ASENJO, J. A.; SUK, J. S. Microbial conversion of methane into poly-*b*-hydroxybutyrate (PHB): growth and intracellular product accumulation in type methanotroph. **Journal of Fermentation Technology**, v. 64, p. 271-278, 1986.

ASTAR, J.; GRUYS, K. J. Biodegradable polymer: Biopol[®]. **In: STEINBÜCHEL, A & DOI, Y. Biopolymers**, v.4. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.

AVÉROUS, L. Biodegradable multiphase systems based on plasticized starch: a review. **Journal of Macromolecular Science**, v. 44, p. 231-274, 2004.

BASTOS, M. S. R.; GURGEL, T. E. P.; FILHO, M. S. M. S.; LIMA, I. F. B.; SOUZA, A. C. R.; SILVA, J. B. Efeito da aplicação de enzimas Pectinolíticas no rendimento da extração de polpa de cupuaçu. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 240-242, 2002.

BASTOS, V. D. Biopolímeros e polímeros de matérias-primas renováveis alternativos aos petroquímicos. **Revista do BNDES**, v. 14, p. 201-234, 2007.

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

BERGER, E.; RAMSAY, B. A.; RAMSAY, J. A.; CHAVARIE, C.; BRAUNEGG, G. PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. **Biotechnology Techniques**, v. 3, p. 227-232, 1989.

BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Engenharia Bioquímica**. Vol.III. São Paulo: Edgard Blücher, 1975.

BOURQUE, D.; POMERLEAU, Y.; GROLEAU, D. High-cell-density production of poly-*b*-hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens*: production of high-molecular-mass PHB. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 367-376, 1995.

- BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1977-1982, 1988.
- BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 65, p. 127-161, 1998.
- BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTY, R.M. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 6, p. 29-37, 1978
- BUCCI, D. Z. **Avaliação de embalagens de PHB (Poli(ácido 3-hidroxibutírico)) para alimentos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2003.
- BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. **Trends Biotechnology**, v. 5, p. 246-250, 1987.
- CARMIGNAN, F.; BIDONE, J.; SENNA, E. L. Emprego dos polihidroxialcanoatos em sistemas de liberação controlada de fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p.131-143, 2008.
- CHANDRA, R; RUSTIGI, R. Biodegradable Polymers. **Program of Polymer Science**, v.23, p. 1273-1335, 1998.
- CHIELLINI, E.; SOLARO, R. Biodegradable polymeric materials. **Advanced Materials**, v. 8, p. 305-313, 1996.
- CHOI, J.; LEE, S. Y. Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutylate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, p. 546-553, 1999a.
- CHOI, J.; LEE, S. Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 51, p. 13-21, 1999b.
- CITROSUCO. Indústria do Grupo Fisher de produção e industrialização de laranja. Disponível em: <<http://www.citrosuco.com.br>>. Acesso em: 13 de outubro de 2008.
- COLLINS, S. H. Carbon substrates in biotechnology. **Society for General Microbiology: Washington, DC**, nº 21, cap. 3, 1987.
- COURI, S. **Tecnologia enzimática: preparações enzimáticas na produção de alimentos**. Embrapa, v.10, p.757, 1998.
- DALCANTON, F. **Produção, extração e caracterização de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* em diferentes substratos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2006.
- DAWES, E. A. **Starvation, Survival and Energy Reserves**. In: Bacteria in Their Natural Environment, Fletcher, M. and Floodgate, G. D. (eds.), Academic Press, Florida, 43-79, 1985.
- DAWES, E. A.; SENIOR, P. J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. **Advances in Microbial Physiology**, v. 10, p. 135-266, 1973.
- DIÁRIO OFICIAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Diário da Assembléia Legislativa Nº 124 de 05/07/07**. Projeto de Lei Nº 664, 2007.
- DOELLE, H.W. **Bacterial Metabolism**. New York .Academic Press, 1975.

FIDLER, S.; DENNIS, D. Polyhydroxyalkanoate production in recombinant *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 103, p. 231-236, 1992.

FIGLIARESE, M. L. **Estratégias de cultivo e recuperação e caracterização de poli (3-hidroxibutirato) produzido por *Ralstonia eutropha***. Dissertação (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2008.

FULLER, R. C. Microbial inclusions with special reference to PHA inclusions and intracellular boundary envelopes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 21-29, 1999.

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

GARCIA, M. C. F. **Proposta de um processo de extração de poli(3-hidroxibutirato) produzido por *Cupriavidus necator* e seu efeito sobre as características do polímero**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2006.

GOMEZ, J. G. C.; BUENO NETTO, C. L. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. **Revista de Engenharia Química**, v. 17, p. 24-29, 1997.

GOMEZ, J. G. C.; FONTOLAN, V.; ALLI, R. C. P.; RODRIGUES, M. F. A.; BUENO NETTO, C. L.; SILVA, L. F.; SIMÕES, D. A. Production of P3HB-co-3HV by soil isolated bacteria able to use sucrose. **Microbiology Reviews**, v. 28, p. 43-48, 1997.

GREER, W. **Peroxide degradation of DNA for viscosity reduction**. United States Patents, U.S. 5627276, Int Cl^{C07H} 001/00, 1997.

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

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

HAHN, S. K.; CHANG, Y. K.; LEE, S. Y. Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 34-39, 1995.

HARRISON, S. T.; CHASE, H. A.; DENNIS, J. S. The disruption of *Alcaligenes eutrophus* by high pressure homogenisation: key factors involved in the process. **Bioseparation**, v. 2, p. 155-166, 1991.

HARRISON, S. T. **The extraction and purification of poly- β -hydroxybutyrate from *Alcaligenes eutrophus***. PhD Dissertation University of Cambridge, UK, 1990.

HEE, P. **Selective recovery of micrometer bioparticles using aggregation and air flotation**. Dissertation (Doctor in Biotechnology)- Delft University of Technology, Delft, Netherlands, 2006.

HEJAZI, P.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; YAMINI, Y. Supercritical fluid dispersion of *Ralstonia eutropha* for Poly(β -hydroxybutyrate) recovery. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 1519-1523, 2003.

HIRATUKA, C.; CUNHA, A. M.; ARAÚJO, R. D.; MELLO, C. H.; CASADEI, J. **Relatório de acompanhamento setorial**. Transformados plásticos, Volume II, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, p. 18, 2008.

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

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

ICIS. Mercado inteligente para indústrias químicas e de energia. Disponível em: <<http://www.icis.com>>. Acesso em: 28 de novembro de 2008.

IENCZAK, J. L. **Valorização de resíduo da agroindústria com a produção de poli(3-hidroxi-butarato) por *Cupriavidus necator***. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2006.

JACQUEL, N.; LO, C.; WEI, Y.; WU, H.; WANG, S. S. Isolation and Purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 15-27, 2008.

JIANG, X.; RAMSAY, J. A.; RAMSAY, B. A. Acetone extraction of mcl-PHA from *Pseudomonas putida* KT2440. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p. 212-219, 2006.

KAPRITCHKOFF, F. M.; VIOTTI, A. P.; ALLI, R. C. P.; ZUCCOLO, M.; PRADELLA, J. G. C.; MAIORANO, A. E.; MIRANDA, E. A.; BONOMI, A. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. **Journal of Biotechnology**, v. 122, p. 453-462, 2006.

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

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

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

KIM, M. N.; LEE, A. R.; YOON, J. S.; CHIN, I. J. Biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate), Sky-Green® and Mater-Bi® by fungi isolated from soils. **European Polymer Journal**, v. 36, p. 1677-1685, 2000.

KIM, S. W.; KIM, P.; KIM, J. H. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from *Methylobacterium organophilum* by potassium limited fed-batch culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 555-560, 1999.

KOLIBACHUK, D.; MILLER, A.; DENNIS, D. Cloning, molecular analysis, and expression of the polyhydroxyalkanoic acid synthase (*phaC*) gene from *Chromobacterium violaceum*, **Applies Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3561-3565, 1999.

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

KOUTINAS, A. A.; XU, Y.; WANG, R.; WEBB, C. Polyhydroxybutyrate production from a novel feedstock derived from a wheat-based biorefinery. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1035-1044, 2007.

LAFFERTY, R. M.; KORSATKO, B.; KORSATKO, W. Microbial Production of Poly-b-hydroxybutyric Acid. In: **Biotechnology**, REHM, H. J.; REED, G. (eds.), VCH Publishers, New York, 135-176, 1988.

LEE, K. M.; CHANG, H. N.; CHANG, Y. K.; KIM, B. S.; HAHN, S. K. The lysis of gram-negative *A. eutrophus* and *A. latus* by palmitoyl carnitine. **Biotechnology Techniques**, v. 7, p. 295-300, 1993.

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

- LEE, S. Y.; LEE, Y. K.; CHANG, H. N. Stimulatory effects of amino acids and oleic acid on poly(3-hydroxybutyric acid) synthesis by recombinant *Escherichia coli*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, p. 177-180, 1995.
- LEE, S. Y. Plastic bacteria - Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Trends Biotechnology**, v. 14, p. 431-438, 1996b.
- LEE, S. Y. Poly(3-hydroxybutyrate) production from xylose by recombinant *Escherichia coli*. **Bioprocess Engineering**, v. 18, p. 397-399, 1998.
- LING, Y.; WONG, H. H.; THOMAS, C. J.; WILLIAMS, D. R. G.; MIDDELBERG, A. P. J. Pilot-scale extraction of PHB from recombinant *E. coli* by homogenization and centrifugation. **Bioseparation**, v. 7, p. 9-15, 1997.
- LU, Z. H.; HE, C. B.; CHUNG, N. T. S. Composites of multifunctional benzylamino-fullerene with low-density polyethylene. **Polymer**, v. 42, p. 5233-5237, 2001.
- LUZIER, W. D. Materials derived from biomass biodegradable materials. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 89, p. 839-842, 1992.
- MARANGONI, C. **Estudo de estratégias de produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* utilizando substrato de baixo custo e ácido propiônico**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2000.
- MARCHESSAULT, R. H.; TERADA, M. Determination of solubility parameters for poly(3-hydroxyalkanoates). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 207-215, 1999.
- MARTIN, O.; AVÉROUS, L. Poly(lactic acid): plasticization and properties of biodegradable multiphase systems. **Polymer**, v. 42, p. 6209-6219, 2001.
- MEREIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; BURKERT, A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de b-galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, p. 336-339, 2008.
- MERRICK, J. M.; DOUDOROFF, M. Depolymerization of poly- β -hydroxybutyrate by an intracellular enzyme system. **Journal of Bacteriology**, v. 88, p. 60-71, 1964.
- MIDDELBERG, A. P. J. Large-scale recovery of recombinant protein inclusion bodies expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.6, p. 225-231, 1996.
- NASCIMENTO, J. F. **Estudo da processabilidade e da caracterização do poli(ácido-3-hidroxibutírico) - PHB obtido a partir de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2001.
- NEIDHART, F.C., INGRAHAM, J.L., SCHAECHTER, M. **Physiology of the bacterial cell: a molecular approach**. Massachusetts : Sinauer, 506p., 1990.
- NOVOZYMES. **A ação das enzimas**. Bioindustrial Group – Novo Nordisk, Novo Allé, 2880 – Bagsvaerd, Dinamarca. Araucária - PR, p. 5-34, 1995.
- OLIVEIRA, N. S. **Solubilidade de gases em membranas poliméricas**. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade de Aveiro, Aveiro - Portugal, 2006.
- PAGE, W.; CORNISH, A. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly-b-hydroxybutyrate. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59(2), p. 4236-4244, 1993.

PELCZAR, M.; REID, R. D.; CHAN, E. C. S. *Microbiologia Conceitos e Aplicações Vol. I*, McGraw-Hill, 524p., 1996.

PEOPLES, O. P.; SINSKEY, A. J. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding β -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 15293-15297, 1989.

PHB INDUSTRIAL. Indústria produtora de plástico biodegradável. Biocycle. Disponível em: <<http://www.biocycle.com.br>>. Acesso em: 17 de agosto de 2008.

POIRIER, Y.; DENNIS, D. E.; KLOMPARENS, K.; SOMEVILLE, C. Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. **Science**, v. 256, p. 520 - 523, 1992.

PRADELLA, J. G. C. **Biopolímeros e intermediários químicos**. Relatório Técnico, Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE), São Paulo-SP, 2006.

PUNRATTANASIN, W. **The utilization of activated sludge polyhydroxyalkanoates for the production of biodegradable plastics**. Dissertation (Doctor in Environmental Science and Engineering) - Faculty of the Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg - VA, 2001.

RAMAKRISHNA, S; MAYER, J.; WINTERMANTEL, E.; LEONG, K. W. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. **Composites Science and Technology**, v. 61, p. 1189-1224, 2001.

RAMSAY, B. A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBE, B.; BATAILLE, P; RAMSAY, J. A. Production of poly-(β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric) acids. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2093-2098, 1990a.

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

RAMSAY, J. A.; HASSAN, M. A.; RAMSAY, B. A.; CHAVARIE, C. Recovery of poly- β -hydroxybutyric and granules by a surfactant-hypochlorite treatment. **Biotechnology Techniques**, v. 4, p. 221-226, 1990b.

RATTEDGE, C.; KRISTIANSEN, B. **Basic biotechnology**. 2 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2001.

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

ROCHA, A. J. Papel versus Plástico. A batalha da proteção do ambiente. **Revista Ciências**, nº 14, mar/abr 2000.

ROSA, D. S.; CHUI, Q. S. H.; FILHO, R. P.; AGNELLI, J. A. M. Avaliação da biodegradação de poli- β -(hidroxibutirato), poli- β -(hidroxibutirato-co-valerato) e poli-(ϵ -caprolactona) em solo compostado. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 12, p. 311-317, 2002.

ROSA, D. S.; PENTEADO, D. F.; CALIL, M, R. Propriedades térmicas e biodegradabilidade de PCL e PHB em um pool de fungos. **Revista de Ciência e Tecnologia**, v. 15, p. 75-80, 2000.

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

RYAN, E.; WARD, O. P. The application of lytic enzymes from *Basidiomycete aphylophores* in production of yeast extract. **Process Biochemistry**, v. 23, p. 12-16, 1998.

SANTOS, R. D.; FERRARI, R. A. Extração aquosa enzimática de óleo de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos de Campinas**, v. 25(1), p. 132-138, 2005.

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

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

SEGEL, I. H. **Enzyme kinetics**. New York: John Wiley, 1993.

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

SERAFIM, L. S.; LEMOS, P. C.; REIS, M. A. M. Change in metabolism of PHA accumulation by activated sludge modifying operating conditions. **Water Science and Technology**, v. 46, p. 353-356, 2002.

SHUMANN, D.; MÜLLER, R. A. **Method for obtaining polyhydroxyalkanoates (PHA) and the copolymers**. US Patent 7070966, 2006.

SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; TORRES, B. B. Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (P3HB-co-3HV) production by *Burkholderia* sp. **Journal of Biotechnology**, v. 76, p. 165-174, 2000.

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

SIM, S. J.; SNELL, K. D.; HOGAN, S. A.; STUBBE, J.; RHA, C.; SINSKEY, A. J. PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 63-67, 1997.

SOMERVILLE, C. R.; NAWRATH, C.; POIRIER, Y. **Processes for producing polyhydroxybutyrate and related polyhydroxyalkanoates in the plastids of higher plants**. US Patent 5610041, 1997.

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

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

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

STEINBÜCHEL, A.; HUSTEDE, E.; LIEBERGESELL, M.; PIEPER, U.; TIMM, A.; VALENTIN, H. Molecular-basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 103, p. 217-230, 1992.

STEINBÜCHEL, A. PHB and other polyhydroxyalkanoic acids. In: **Biotechnology**, Rehm, H. J. and Reed, G. (eds.), VCH, New York, 403-464, 1996.

STEINBÜCHEL, A.; PIEPER, U. Identification, cloning and sequence analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase gene of the gram positive bacterium *Rhodococcus ruber*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 96, p. 73-80, 1992.

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

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

SUZUKI, D. V.; CARTER, J. M.; RODRIGUES, M. F. A.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E. Purification of polyhydroxybutyrate produced by *Burkholderia cepacia* IPT64 through a chemical and enzymatic route. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 771-775, 2008.

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

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

VINHAS, G. M.; ALMEIDA, Y. M. B.; LIMA, M. A. G. A. Estudo das propriedades e biodegradabilidade de blendas de poliéster/amido submetidas ao ataque microbiano. **Química Nova**, v. 6, p. 1587-1588, 2007.

WANG, F.; LEE, S.Y. Poly(3-hydroxybutyrate) production with high polymer content by fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3703-3706, 1997.

WEGEN, R. J. van; LING, Y.; MIDDELBERG, A. P. J. Industrial production of polyhydroxyalkanoates using *Escherichia coli*: an economic analysis. **Trans IChemE**, v. 76, p. 417-426, 1998.

WESTFALIA SEPARATOR. Indústria de separadores e decantadores. Disponível em: <<http://www.westfalia-separator.com>>. Acesso em: 24 de novembro de 2008.

WILLIAMS, M. D.; FIENO, A. M. ; GRANT, R. A.; SHERMAN, D. H. Expression and analysis of a bacterial poly(hydroxyalkanoate) synthase in insect cells using baculovirus system. **Protein expression and purification**, v. 7, p. 203-211, 1996.

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

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

YASOTHA, K.; AROUA, M. K.; RAMACHADRAN, K. B.; TAN, I. K. P. Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, p. 260-268, 2006.

YEO, J. S.; PARK, J. Y.; YEOM, S. H.; YOO, Y. J. Enhancement of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) productivity by the two-stage supplementation of carbon sources and continuous feeding of NH₄Cl. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 13, p. 14-24, 2008.

ZUCCOLO, M.; RIBEIRO, A. M. M.; OGAKI, Y.; ALLI, R. C. P.; BUENO NETTO, C. L.; **Anais do V Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas**, Maringá, Brasil, 1996.

ANEXOS

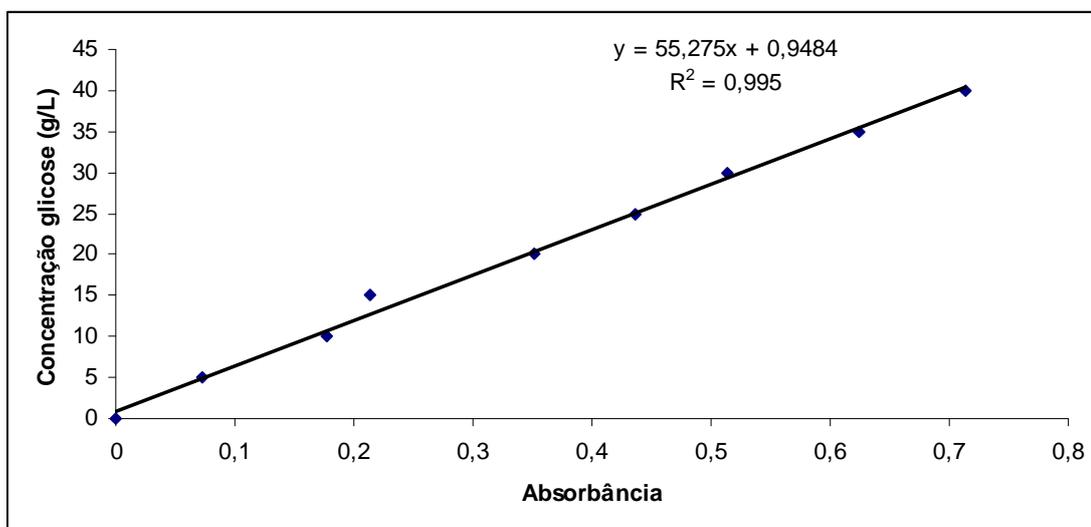


Figura A.1 - Curva padrão para a determinação da concentração de glicose.

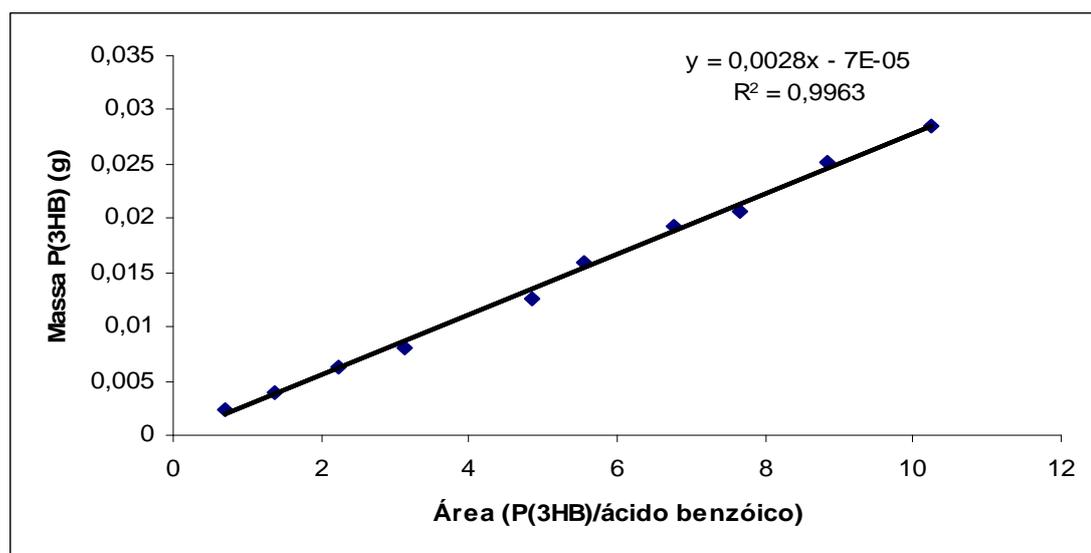


Figura A.2 - Curva padrão para determinação da massa de P(3HB) nas células e filmes.

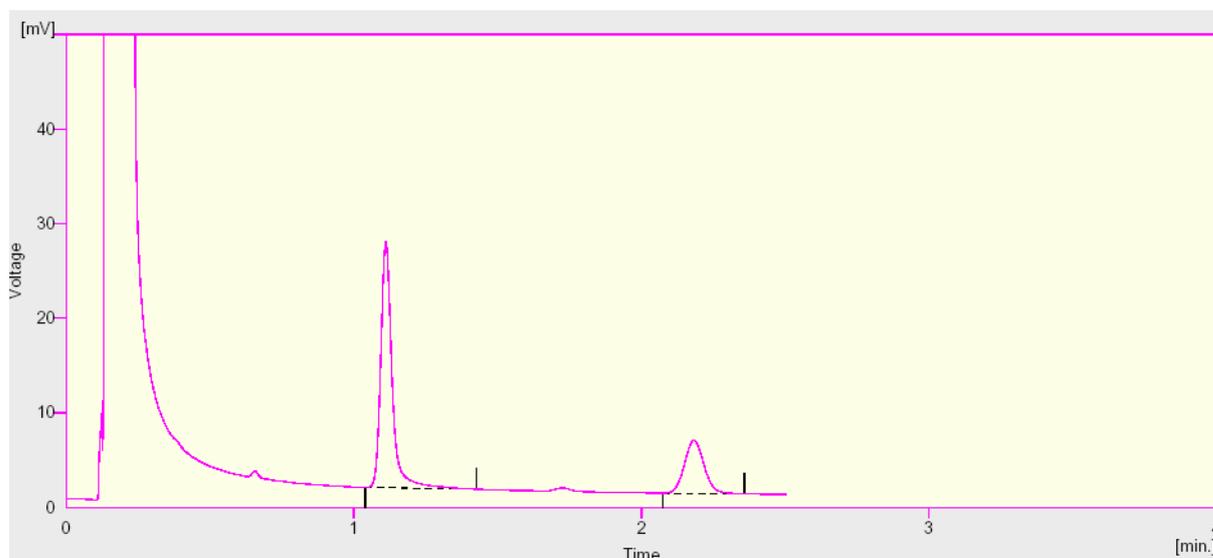


Figura A.3 - Exemplo de cromatograma obtido para quantificação de P(3HB) através de análise por cromatografia gasosa.

Tukey HSD test; variable % P(3HB)										
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests										
Error: Between MS = ,04873, df = 9,0000										
Cell No.	Ensaio	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}
		39,140	,71000	3,9300	82,820	1,5400	6,8300	84,810	1,6100	7,0400
1	1		0,000224	0,000224	0,000224	0,000224	0,000224	0,000224	0,000224	0,000224
2	2	0,000224		0,000224	0,000224	0,065331	0,000224	0,000224	0,042529	0,000224
3	3	0,000224	0,000224		0,000224	0,000238	0,000225	0,000224	0,000244	0,000224
4	4	0,000224	0,000224	0,000224		0,000224	0,000224	0,000343	0,000224	0,000224
5	5	0,000224	0,065331	0,000238	0,000224		0,000224	0,000224	0,999992	0,000224
6	6	0,000224	0,000224	0,000225	0,000224	0,000224		0,000224	0,000224	0,982180
7	7	0,000224	0,000224	0,000224	0,000343	0,000224	0,000224		0,000224	0,000224
8	8	0,000224	0,042529	0,000244	0,000224	0,999992	0,000224	0,000224		0,000224
9	9	0,000224	0,000224	0,000224	0,000224	0,000224	0,982180	0,000224	0,000224	

Figura A.4 - Resposta obtida através do teste de Tukey HSD para o experimento: Influência do tipo de solvente e tempo de hidrólise sobre a extração de P(3HB).