

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Dissertação

PRODUÇÃO DO BIOPLÁSTICO POLI-(3HIDROXIBUTIRATO) [(P3HB)] POR
Bacillus megaterium CN3 SUPLEMENTADO COM LIPÍDEOS

Mariane Igansi Alves

Química de Alimentos

Pelotas, março de 2016

MARIANE IGANSI ALVES

**PRODUÇÃO DO BIOPLÁSTICO POLI-(3HIDROXIBUTIRATO) [(P3HB)] POR
Bacillus megaterium CN3 SUPLEMENTADO COM LIPÍDEOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito final à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de orientação: Prof^a. Dr^a. Angelita da Silveira Moreira
Prof^a. Dr^a. Claire Tondo Vendruscolo
Prof^a. Dr^a. Lígia Furlan

Pelotas, março de 2016.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

A314 Alves, Mariane Igansi

Produção do bioplástico Poli-(3hidroxibutirato) [(P3hB)] por *Bacillus megaterium* CN3 suplementado com lipídeos / Mariane Igansi Alves ; Angelita da Silveira Moreira, orientadora ; Claire Tondo Vendruscolo, Lígia Furlan, coorientadoras. — Pelotas, 2016.

107 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Bioplástico. 2. Polihidroxialcanoatos. 3. *Bacillus megaterium*. 4. Ácido butírico. 5. Óleo de arroz. I. Moreira, Angelita da Silveira, orient. II. Vendruscolo, Claire Tondo, coorient. III. Furlan, Lígia, coorient. IV. Título.

CDD : 574.192

**PRODUÇÃO DO BIOPLÁSTICO POLI-(3HIDROXIBUTIRATO) [(P3HB)] POR
Bacillus megaterium CN3 SUPLEMENTADO COM LIPÍDEOS**

Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Fiorentini

Doutora em Ciência dos Alimentos- Universidade Federal de Pelotas

Prof^o. Dr. Érico Kunde Corrêa

Doutor em Biotecnologia Agrícola – Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Lígia Furlan

Doutora em Química- Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Angelita da Silveira Moreira

Doutora em Biotecnologia- Universidade Federal de Pelotas (Presidente)

“Morre lentamente quem não vira a mesa quando está infeliz com seu trabalho, quem não arrisca o certo pelo incerto para ir atrás de um sonho, quem não se permite pelo menos uma vez na vida fugir dos conselhos sensatos”.

Luís Fernando Veríssimo

DEDICAÇÃO

Este trabalho, assim como todos os outros que já realizei e que ainda vou realizar, dedico aos meus pais, por tudo que já fizeram e fazem por mim.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por conquistar mais um objetivo na minha vida.

Meus queridos pais Luiz Fernando e Rose Meri, juntamente com a minha irmã Marcele e toda a minha família, por sempre me apoiarem, por sacrificarem muitas coisas para que eu pudesse estar onde estou, tudo o que eu sou e serei daqui em diante, é por causa de vocês.

Ao meu namorado, Guilherme, por toda a força, incentivo e companheirismo nessa etapa assim como todas as outras.

À professora Angelita da Silveira Moreira, pela oportunidade de realizar o mestrado, pela orientação e disponibilidade.

As professoras Claire Tondo Vendrusculo e Lígia Furlan pela co-orientação nessa etapa.

À banca examinadora, Prof.^a Dr.^a Ângela Maria Fiorentini, Prof^o. Dr. Érico Kunde Corrêa e a Prof^a. Dr^a. Lígia Furlan, pelo aceite para avaliar o meu trabalho.

Aos queridos colegas do laboratório de Biopolímeros, Karine, Júlia, Victoria, Andiará, Vanessa, Maria, Lúcia, Amanda, Dener, Matheus, Ana Cláudia, e todos os outros que já passaram por lá nesses dois anos, pelo apoio, amizade e ajuda nos experimentos.

À Universidade Federal de Pelotas, ao Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realizar o mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul pelo apoio financeiro.

A todos que de uma forma ou de outra participaram deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

ALVES, Mariane Igansi. **Produção do bioplástico Poli-(3hidroxibutirato) [(P(3HB))] por *Bacillus megaterium* CN3 suplementado com lipídeos** 2016. 107f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS.

O poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)] é o biopolímero mais estudado e caracterizado dentre a família dos polihidroxicanoatos (PHAs). É um polímero plástico que tem como principais características a rápida biodegradabilidade e a atoxicidade. A síntese de P(3HB) ocorre da seguinte forma: primeiramente há uma fase de crescimento não limitado, com o objetivo de crescimento celular, seguida da produção do polímero e seu acúmulo, que ocorre somente em condições de limitação de algum nutriente essencial como P, Fe, Mg, N com excesso de carbono. Portanto, o objetivo desse trabalho foi aumentar a concentração celular e o acúmulo de grânulos de P(3HB) em cultivo de *Bacillus megaterium* CN3 pela suplementação do meio padrão com ácido butírico e óleo de arroz. O bioprocessamento foi realizado em duas etapas, o inóculo foi produzido em *Erlenmeyers* aletados de 500mL, contendo 160mL de meio YM e 40mL de suspensão bacteriana, mantidos em incubador agitador orbital por 24h, 150rpm e 36 °C. A segunda etapa, produção do P(3HB), foi realizada utilizando *Erlenmeyers* aletados de 500mL, contendo 160mL de meio mineral F4 e YM e 20% de inóculo contendo concentrações de ácido butírico (0 a 3mM) em diferentes pH (5 a 8); óleo de arroz (0 a 10mL/L) e Tween80-Lecitina de soja (10 a 40g/L), mantidos em 36 °C, 200rpm até 72h em incubador agitador orbital. Após a fermentação, foram realizadas as análises de: Biomassa celular através da Densidade óptica (DO) e a determinação da Massa Celular Seca (MCS); Para a análise de extração do polímero, a MCS foi submetida à agitação com clorofórmio na proporção 40:1v/m sob a temperatura de 58 °C. Ao adicionar óleo de arroz com os emulgentes Tween80-Lecitina de soja nas concentrações de 5mL/L de óleo de arroz e 25g/L, respectivamente, a MCS aumentou. A adição de 3mM do ácido butírico e pH 8 em 72h na fase de produção, alcançou o maior acúmulo de polímero.

Palavras-chave: Bioplástico, Polihidroxicanoatos, *Bacillus megaterium*, Ácido butírico, Óleo de arroz

ABSTRACT

ALVES, Mariane Igansi. **Produção do bioplástico Poli-(3hidroxibutirato) [(P(3HB)] por *Bacillus megaterium* CN3 suplementado com lipídeos.** 2016. 107f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS.

Poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] is the most studied and characterized biopolymer from the family of polyhydroxyalkanoates (PHAs), is a plastic polymer that has as main features the rapid biodegradability and low toxicity. He synthesis of P(3HB) is as follows: first there is a non-limited growth phase, with the objective of cell growth, then the production of the polymer and its accumulation that occurs only in limited conditions of some essential nutrient as P, Fe, Mg, N, with excess carbon. Therefore, the aim of this study was to increase the cell concentration and accumulation of granules of P(3HB) in cultivation of *Bacillus megaterium* CN3 by supplementation of the standard medium with butyric acid and rice oil. The bioprocess was performed in two steps, the inoculum was produced in Erlenmeyer flasks finned 500mL containing 160 ml of YM medium and 40 ml of bacterial suspension, kept in an orbital shaker incubator for 24h, 150rpm and 36 °C. The second step, producing P(3HB) was carried out using Erlenmeyer flasks finned 500ml containing 160mL of mineral medium F4 and YM and a 20% inoculum containing butyric acid concentrations (0 to 3 mM) at different pH (5 to 8); rice oil (0 to 10 mL/L) and Tween80 soybean lecithin (10 to 40g/L) maintained at 36 °C, 200rpm until 72 hours in an orbital shaker incubator. After fermentation, the analyzes were performed: cell biomass by optical density (OD) and the determination of mass Mobile Dry (MCS); For the polymer analysis extraction, MCS was subjected to shaking with chloroform in the ratio 40:1v/m under the temperature of 58 °C. By adding rice bran oil with emulsifiers Twen80 - Lecithin soya at concentrations of 5 ml/L the rice oil and 25g/L the Twen80 - Lecithin soya, respectively, MCS increased. The addition of 3mM of butyric acid and pH 8 at 72h in the production stage, achieved the highest polymer buildup.

Keywords: Bioplastics, Polyhydroxyalkanoates, *Bacillus megaterium*, butyric acid, rice oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação dos polímeros biodegradáveis.....	20
Figura 2. Representação da morfologia dos grânulos de PHA nas células bacterianas: A) observado em microscópio de contraste de fase; B) observado em microscópio de transmissão eletrônica; C) de força atômica mostrando a presença de partículas globulares na superfície dos grânulos; D) com uma monocamada de proteína de superfície.....	23
Figura 3. Representação esquemática do grânulo de PHA.....	24
Figura 4. Estrutura geral dos PHAs.....	25
Figura 5. Esquema de rotas metabólicas para síntese de PHA.....	28
Figura 6. Fase da biossíntese de PHA.....	29
Figura 7. Ciclo fechado para a produção e degradação de PHA.....	30
Figura 8. Metabolismo balanceado e condição de limitação de nutrientes e excesso de carbono.....	38
Figura 9. Via de síntese de Poli(3-hidroxi-butirato).....	39
Figura 10. Esquema das principais rotas metabólicas de síntese de biomassa residual e P(3HB) a partir de diferentes fontes de carbono.....	41
Figura 11. Processo de produção de P(3HB) com suas fases de produção, recuperação e sua aplicabilidade.....	43
Figura 12. Massa Celular Seca em 24, 48 e 72h com temperatura de 36°C e pH 6,5.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Consumo per capita de plásticos no mundo (Kg/habitante).....	18
Tabela 2. Propriedades de diferentes PHAs comparados com diferentes polímeros petroquímicos.	26
Tabela 3. Produção a nível mundial de P(3HB.)	34
Tabela 4. Comparação entre as características do P(3HB) e do polipropileno (PP).	36
Tabela 5. Características das diferentes PHB polimerases.	40
Tabela 6. Produção de PHA por diferentes microrganismos.	45
Tabela 7. Acúmulo de PHA por alguns Bacillus.....	48
Tabela 8. Rendimento de P(3HB) por diferentes fontes de nutrientes e gênero de Bacillus.....	52
Tabela 9. Rendimentos de massa celular seca e acúmulo de P(3HB) obtidos em cultivos de diferentes microrganismos, fontes de carbono e nitrogênio.	58
Tabela 10. Rendimentos de massa celular seca (MCS) e acúmulo de P(3HB) obtidos em cultivos de diferentes microrganismos em diferentes condições, em shaker e biorreator.	64
Tabela 11. Tratamentos utilizados para as diferentes concentrações de óleo de arroz e Twee80- Lecitina de soja em valores codificados e valores reais... ..	71
Tabela 12. Concentrações de ácido butírico e pH nos diferentes tratamentos em níveis codificados e níveis reais.	81

LISTA DE ABREVIATURAS

ABRELPE- Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais

MMA- Ministério do Meio Ambiente

PHAs- Polihidroxicanoatos

P(3HB)- Poli(3-hidroxiacetato)

PP- Polipropileno

PET- Politereftalato de etileno

PE- Polietileno

PVC- Policloreto de vinila

PET- Polietilenotereftalato

PS- Poliestireno

HA- Hidroxiácidos

P(3HB-co-3HV)- Poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato)

P(4HB)- Poli(3-hidroxiacetato)

P(3HB-co-4HB)- Poli(3-hidroxiacetato-co-4-hidroxiacetato)

P(4HHx-co-3HO)- Poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato)

PHB-HHx- Poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato)

PHA_{scl}- PHAs de cadeia lateral curta

PHA_{mcl}- PHAs de cadeia lateral média

PHA_{lcl}- PHAs de cadeia lateral mais longa

B. megaterium- Bacillus megaterium

EMP- Embden- Meyerhoff- Parns

EDP- Entner- Doudoroff

OD -oxigênio dissolvido

AYN-*Nutritive Yeast Agar*

DO- Densidade Óptica

MCS- Massa Celular Seca

YM- *Yest Malt Agar*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	15
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1.1- Plasticidade dos polímeros.....	17
1.2- Plásticos biodegradáveis.....	19
1.3- Biopolímeros.....	20
1.4- Polihidroxialcanoatos- PHAs.....	21
1.4.1- Estrutura dos grânulos de PHAs.....	22
1.4.2- Estrutura química dos PHAs.....	24
1.4.3- Propriedades físicas e químicas dos PHAs.....	25
1.4.4- Síntese de PHAs.....	27
1.4.5- Produção de PHAs.....	29
1.4.6- Recuperação dos PHAs.....	30
1.4.7- Degradabilidade.....	31
1.4.8- Mercado e Produtos obtidos com PHAs.....	32
1.5 -Poli(3-hidroxi- <i>butirato</i>)- P(3HB).....	33
1.5.1- Propriedades físicas e químicas do P(3HB).....	35
1.5.2 - Metabolismo para a produção do P(3HB).....	38
1.5.3- Produção do P(3HB).....	42
1.6 - Microrganismos produtores de PHA.....	44
1.6.1- Gênero <i>Bacillus</i>	46
1.6.2- Produção de P(3HB) por <i>Bacillus megaterium</i>	49
1.7- Meio de cultivo.....	52
1.8- Condições de cultivo – Tempo, temperatura, pH e oxigênio.....	59
2. Hipótese e Objetivos.....	66
2.1 Hipótese.....	66

2.2- Objetivos	66
2.2.1- Objetivo geral.....	66
2.2.2- Objetivos específicos.....	66
3. Capítulo 1	68
Crescimento celular e acúmulo de polímero de Poli(3-hidroxi- butirato) por <i>Bacillus megaterium</i> CN3: influência da adição de lipídeos emulsionados.....	68
1. Introdução.....	68
2. Material e Métodos.....	70
3. Resultados e Discussão	71
4. Conclusão.....	76
5. Referências Bibliográficas	76
4. Capítulo 2	78
Crescimento celular e acúmulo de Poli(3-hidroxi- butirato) por <i>Bacillus megaterium</i> CN3: influência do pH e adição do precursor ácido butírico.....	78
1. Introdução.....	78
2. Material e Métodos.....	79
3. Resultados e Discussão	81
4. Conclusão.....	87
5. Referências Bibliográficas	87
4. Considerações finais	90
5. Referências Bibliográficas	91

INTRODUÇÃO GERAL

Os plásticos convencionais obtidos a partir do petróleo, devido a sua durabilidade e resistência, têm sido, por décadas, usados indiscriminadamente (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006). Por não reagirem quimicamente com a maioria das substâncias, esses materiais são de lenta degradabilidade, provocando problemas nos aterros sanitários, dificultando a troca de gases e a decomposição de outros compostos (LUENGO et al., 2003)

No Brasil, segundo o Panorama de Resíduos Sólidos, divulgado pela Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais (ABRELPE), evidencia-se que a cada dia são geradas 201.058 toneladas de resíduos sólidos urbanos (RSU). Ao analisar o total da geração per capita das cinco regiões, estima-se que cada brasileiro gera, em média, 1,228Kg de resíduos sólidos por dia (ABRELPE, 2012). Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA), no país, são distribuídos, por hora, cerca de 1,5 milhões de sacolas plásticas (BRASIL, 2015). Com isso, gera-se quantidades enormes de lixo aumentando ainda mais o problema de degradação.

O crescente interesse científico e popular pela área de preservação ambiental, associado ao da área industrial pela continuidade do crescimento de consumo de plásticos, têm tornado necessários à pesquisa e o desenvolvimento de substitutos ecologicamente corretos. Neste aspecto, a utilização de biopolímeros está se tornando cada vez mais interessante como alternativa à substituição de plásticos convencionais, devido a sua principal característica- a biodegradabilidade - e os produtos que a reação de degradação gera - água (H₂O) e gás carbônico (CO₂) (LUVIZETTO, 2007). A rápida degradação, através da ação enzimática microbiana sob condições ambientais favoráveis, e as características de termoplasticidade e biocompatibilidade fazem com que os bioplásticos, em geral, sejam cada vez mais estudados para substituírem os plásticos convencionais (PIEMOLINI, 2004).

Polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres sintetizados por inúmeros microrganismos e armazenados em formas de inclusões citoplasmáticas para a reserva de energia (HOLMES, 1985). Suas propriedades físicas como um material plástico são: elevado ponto de fusão, baixa rigidez, alta resistência à pressão, resistência ao alongamento antes da ruptura e forte resistência ao

impacto (POIRIER; NAWRATH; SOMERVILLE, 1995). O Poli(3-hidroxi-butarato) (P3HB) é o biopolímero mais estudado dentre os PHAs (HOLMES, 1985; CHANPRATEEP, 2010). Esses polímeros biodegradáveis de hidroxialcanoatos podem ser obtidos em grande escala através de bioprocessos (PIEMOLINI, 2004).

A síntese de PHAs ocorre, normalmente, quando há condições desfavoráveis para o seu crescimento em relação às nutrientes essenciais, pH, aeração entre outros, e com excesso de carbono (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005). Inúmeras bactérias Gram positivas e Gram negativas podem sintetizar inúmeros PHAs; porém, em escala industrial, são utilizadas bactérias Gram negativas como *Cupriavidus necator* (antiga *Ralstonia eutropha*), *Pseudomonas oleovorans* e estirpes de *Escherichia coli* recombinante (VALAPPIL et al., 2007).

Bacillus megaterium foi o primeiro microrganismo no qual foi identificado corpos de inclusão constituídos de PHAs, mais especificamente P(3HB). Tem sido amplamente utilizada para a produção de diferentes bioprodutos, como a penicilina sintética e a vitamina B₁₂, porém, ainda não é utilizada industrialmente para a produção de P(3HB) apesar de já ter sido alvo de alguns estudos (FACCIN, 2012). Pode ser encontrada em abundância nos solos diversos e possuir grande vantagem de crescer em diversas fontes de carbono e também ser capaz de produzir o bioplástico utilizando resíduos agroindustriais (LUVIZETTO, 2007). *B. megaterium* apresenta características interessantes para sua utilização no processo de produção industrial de bioplástico, tais como a tolerância à altas temperaturas e pressão osmótica, tornando o processo mais estável, ainda que com pequenos distúrbios, e rápido crescimento celular (FACCIN, 2013).

Uma cepa de *B. megaterium* identificada como CN3, isolada pela equipe de pesquisadores do Laboratório de Biopolímeros do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas e mantida em sua coleção de cultura. Mostrou-se capaz de acumular quantidades expressivas de P(3HB) a partir de sacarose e glicose como fonte de carbono, além de ter o melhor crescimento em temperatura relativamente elevada, em torno de 36°C (RODRIGUES et al., 2014). Assim, tornou-se alvo do presente estudo que teve como foco a sua utilização na produção de P(3HB).

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1-Plasticidade dos polímeros

Polímeros são macromoléculas peculiares, caracterizadas pelo seu tamanho, estrutura química e interações intra e intermoleculares. Possuem unidades químicas unidas por ligações covalentes que se repetem ao longo da cadeia, podendo ser naturais, como a seda, a celulose, as fibras de algodão, entre outros, ou sintéticos, como polipropileno (PP), o politereftalato de etileno (PET), o polietileno (PE), o policloreto de vinila (PVC) (MANO; MENDES, 1999). Em função das principais características físicas são classificados como: termoplásticos (plásticos), termorrígidos, borrachas e fibras (AGNELLI, 1996).

Plasticidade, é definido como a propriedade de sólidos finos, entre largos limites de umidade, que submetem a grandes deformações permanentes, sem sofrer ruptura, fissuramento ou variação de volume apreciável (BARBA et al., 1997). Facilmente processáveis a temperaturas baixas, quando comparadas a temperatura de processamento de outros materiais, faz com que a produção de plásticos tenha um consumo de energia relativamente baixo, refletindo no custo da fabricação. Uma outra vantagem apresentada, é a facilidade que outras substâncias podem ser adicionadas para conferir novas propriedades, podendo ser possível a alteração da cor, cheiro, elasticidade, resistência a impactos, resistência ao calor e a luz, entre outros aspectos, resultando em uma ampliação em seu uso. Essas substâncias são denominadas de aditivos, podendo ser desde plastificantes que são utilizados para aumentar a flexibilidade, lubrificantes, para reduzir a viscosidade, antioxidantes, que aumentam à resistência a oxidação provocada pelo oxigênio e ozônio atmosféricos, biocidas, para inibir a degradação por microrganismos, entre outros (PIATI, RODRIGUES, 2005).

O consumo de plásticos não biodegradáveis *per capita* no mundo (Tab. 1) no ano de 2015 foi de 45Kg/habitante, e no Brasil, o valor foi de 46Kg/habitante. Embora o consumo *per capita* de produtos plásticos no Brasil possa ser considerado modesto em comparação ao consumo dos países desenvolvidos, já que em 2005 o consumo local era de cerca de 25% do consumo *per capita* dos habitantes do Nafta (Estados Unidos, Canadá e

México) e da Europa, sua perspectiva de crescimento no consumo entre 2005 e 2015, de 100%, é igualada apenas aquela da Europa Oriental. Porém, mesmo após esse crescimento ocorrer, o consumo per capita brasileiro deverá alcançar apenas 33% do consumo nos países desenvolvidos (BRASIL,2016). Esse dado, entretanto, não é por si nada alentador, visto não haver por parte das autoridades nacionais, ações que coíbam o crescimento indiscriminado do consumo de plásticos descartáveis não biodegradáveis. Adicionalmente, a atual baixa mundial do petróleo pode estimular ainda mais o consumo do mesmo na produção de plásticos petroquímicos.

Tabela 1. Consumo *per capita* de plásticos no mundo (Kg/habitante).

Local	1980	2005	2015	2005-2015 (%)
Mundo	11	30	45	50
Nafta	46	105	139	32
Europa Ocidental	40	99	136	37
Europa Oriental	9	24	48	100
Japão	50	89	108	21
América Latina	7	21	32	52
Oriente Médio e África	3	10	16	60
Ásia (exceto o Japão)	2	20	36	80
Brasil	-	13	46	100

Fonte. PLASTIC EUROPE 2012; ABIPLAST, 2013.

Inicialmente, a grande difusão do uso de materiais plásticos em nossa sociedade se deu justamente por sua durabilidade, porém essa propriedade tornou o material plástico um grande vilão do meio ambiente. Entre as possíveis soluções para esse mal, está a redução da produção/consumo, a incineração, a reciclagem e a degradação (CANTO, 2001).

A toxicidade de diversos poluentes ambientes tem sido habitualmente investigada quanto a sua teratogenicidade e carcinogenicidade em seres humanos e demais espécies (COLBORN, 1995). Um dos materiais tóxicos produzidos é denominado de xenoestrógeno aplicado livremente a uma série de substâncias químicas tóxicas produzidas pelo homem que confundem os receptores celulares dos estrogênios no organismo, interferindo nas mensagens bioquímicas naturais (IMEBI, 2016).

Os xenoestrogênicos são na maioria gerados pela indústria petroquímica. Muitos dos mimetizadores hormonais são organoclorados produzidos pela reação do gás cloro com hidrocarbonetos do petróleo. São utilizadas em plásticos, agrotóxicos, solventes, agentes de branqueamento, refrigerações e outros produtos químicos (IMEBI, 2016).

Nesse cenário, novos desenvolvimentos na área de polímeros têm sido realizados para ofertar produtos que possuam boas propriedades mecânicas, mas que tenham um impacto menos drástico no ambiente. Assim, nesse contexto, surgiram os polímeros biodegradáveis, que tendem a dar uma solução ao problema de acúmulo de resíduos plásticos gerados em nossa sociedade.

1.2- Plásticos biodegradáveis

Os plásticos biodegradáveis podem ser divididos em três tipos: completamente biodegradáveis, fotobiodegradáveis e semibiodegradáveis. O primeiro tipo são aqueles que apresentam a característica intrínseca de biodegradação. Já os fotobiodegradáveis são polímeros que possuem em sua composição aditivos que incorporam na cadeia polimérica grupos sensíveis à luz; quando expostos à radiação ultravioleta, inicia-se o processo de degradação, permitindo muitas vezes a biodegradação. Plásticos semibiodegradáveis são blendas produzidas pela incorporação de polímeros biodegradáveis, como amido, a um polímero plástico que não é biodegradável com isso, os microrganismos são capazes de atacar o amido e realizar a biodegradação, porém, a parte não amido do polímero continua sendo não biodegradável (REDDY et al., 2003).

Os polímeros completamente biodegradáveis são classificados em 4 grupos, como pode-se observar na Fig. 1: agropolímeros, que são obtidos geralmente por fracionamento de biomassa a partir de agroprodutos e são divididos entre polissacarídeos, proteínas e lipídeos. No segundo grupo encontram-se os polímeros que são sintetizados por microrganismos à partir de fontes renováveis, como no caso dos Polihidroxialcanoatos (PHAs), já o terceiro grupo é caracterizado por serem sintetizados quimicamente por monômeros derivados de processos biotecnológicos, como por exemplo poli(ácido lático) (PLA), que pode ser obtido através da polimerização do ácido

lático por microrganismos. No último grupo, encontram-se os polímeros biodegradáveis de fontes não renováveis sintetizados por processos petroquímicos (AVEROUS; BOQUILLON, 2004).

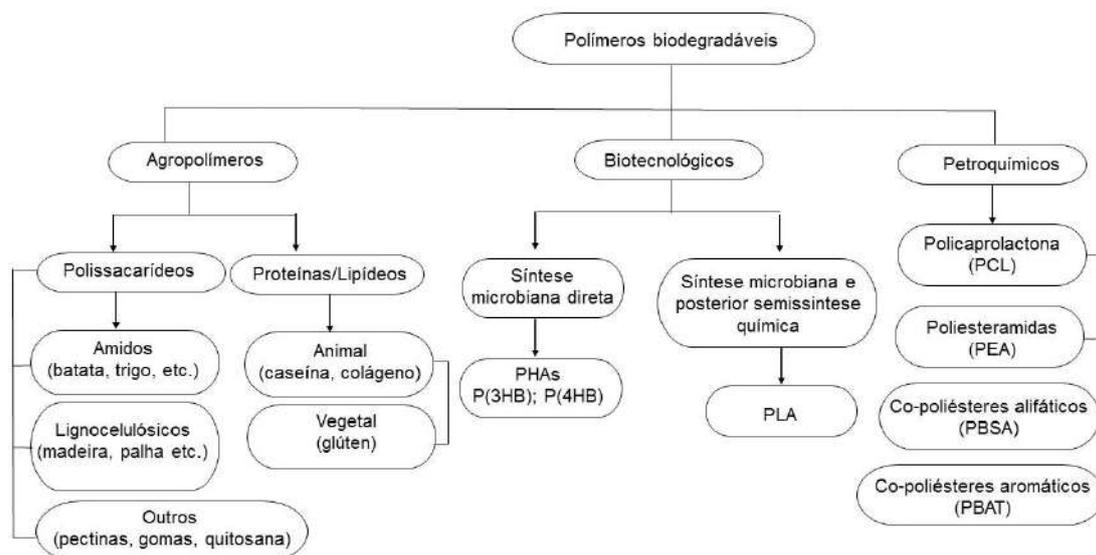


Figura 1. Classificação dos polímeros biodegradáveis.

Fonte: Adaptado de AVEROUS; BOQUILLON, 2004.

Embora um material possa ser biodegradável, sua decomposição no ambiente depende de vários fatores, tais como: a forma como esse polímero será descartado, a presença de microrganismos geradores de enzimas específicas para sua decomposição, temperatura, pH, teor de oxigênio no meio, nutrientes, dentre outros (GRAEBLING et al., 1993).

1.3- Biopolímeros

Há alguns anos, tem-se um considerável interesse em polímeros polissacarídeos obtidos por microrganismos, também conhecidos como biopolímeros (BORGES et al, 2004). Sua importância deve-se, principalmente, à capacidade de formarem géis e soluções viscosas em meio aquoso. A produção em meio líquido pode ser pelo cultivo do microrganismo em meio que contém carbono e sais minerais ou por via enzimática (PADILHA, 1997). O termo biopolímero tem sido usado de forma mais ampla, abrangendo todo tipo de polímeros de origem biológica.

Os biopolímeros são classificados em oito grupos, considerando a sua estrutura química: ácidos nucleicos (DNA, RNA), poliamidas (proteínas,

poliaminoácidos), polissacarídeos (amido, glicogênio, celulose), polioxiésteres orgânicos (poli (3-hidroxi-butirato), poli (ácido málico)), politioésteres (polimercaptoprionato), poliésteres inorgânicos (polifosfatos), poli-isoprenoides (borracha natural), polifenóis (lignina) (HOLMES, 1985).

Os plásticos biodegradáveis vêm, cada vez mais, ganhando importância e a maioria deles é algum tipo de biopolímero.

1.4- Polihidroxicanoatos- PHAs

Em 1888 houve, pela primeira vez, relatos sobre a descoberta de grânulos lipofílicos brilhantes em células de *Beijeirinckia*, porém, apenas em 1923, utilizando *Bacillus megaterium*, Maurice Lemoigne determinou o primeiro composto chamado de ácido 3-hidroxi-butírico [P(3HB)] e identificou esse material com um provável material de reserva. Durante os trinta anos seguintes, o interesse no P(3HB) ficou restrito à descrição de métodos de detecção e determinação do teor do bioplástico nas células e das condições de cultura que levasse a sua síntese e degradação pelo bacilo. Já em 1958, Macre e Wilkinson verificaram que o armazenamento de grânulos através do *B. megaterium* aumentava quando se elevava as proporções de glicose e nitrogênio do meio de cultivo, concluindo que esses compostos são considerados uma fonte de carbono e energia para o microrganismo estudado (CARMIGAN, 2006).

No Brasil, a tecnologia da produção de PHAs como plásticos biodegradáveis e biocompatíveis teve seu início na década de 90, através do Instituto de Pesquisa e Tecnologia (IPT), Copersucar® e Universidade de São Paulo, utilizando carboidratos como material inicial e buscando estratégias para a utilização de microrganismo oriundo do solo brasileiro (IPT, 2006).

O baixo custo da produção de açúcar no país, juntamente com o excedente energético das usinas de açúcar e álcool, viabilizou a produção integrada desses polímeros no Brasil. Com isso, foi inaugurada em setembro de 2000 a PHB Industrial, uma empresa que produzia e comercializava plástico biodegradável tipo P(3HB) sob o nome Biocycle® (NONATO et al., 2001). A indústria que atuou até 2015 em escala piloto chegou a exportar o polímero para o Japão. Atualmente, a planta industrial encontra-se desativada.

Os PHAs representam uma classe de poliésteres naturais que possuem como fonte diversos microrganismos que os acumulam sob a forma de grânulos intracelulares com função de reserva de carbono para obtenção de energia (MADISON; HUISMAN et. al., 1999); o acúmulo pode ultrapassar 80% (BYROM, 1987). Esses polímeros têm atraído bastante atenção por serem termoplásticos, biodegradáveis e elastômeros, além de poderem ser produzidos através de fontes renováveis (HOLMES, 1985; STEINBÜCHEL; FÜCHTENBUSCH, 1998).

1.4.1- Estrutura dos grânulos de PHAs

A superfície do grânulo é composta por uma camada de fosfolípido e proteínas, predominantemente PHAsins, ou seja, uma classe de proteínas que é capaz de influenciar o número e o tamanho do grânulo. A estereoespecificidade das enzimas biossintéticas são responsáveis pela configuração estereoquímica S, característica apresentada por todos os PHAs conhecidos até o momento (KESSLER; WITHOLT, 1999; PÖTTER et al., 2002). Na Fig. 2 (2A a 2D), pode-se observar a morfologia dos grânulos de PHA captadas por diversas técnicas.

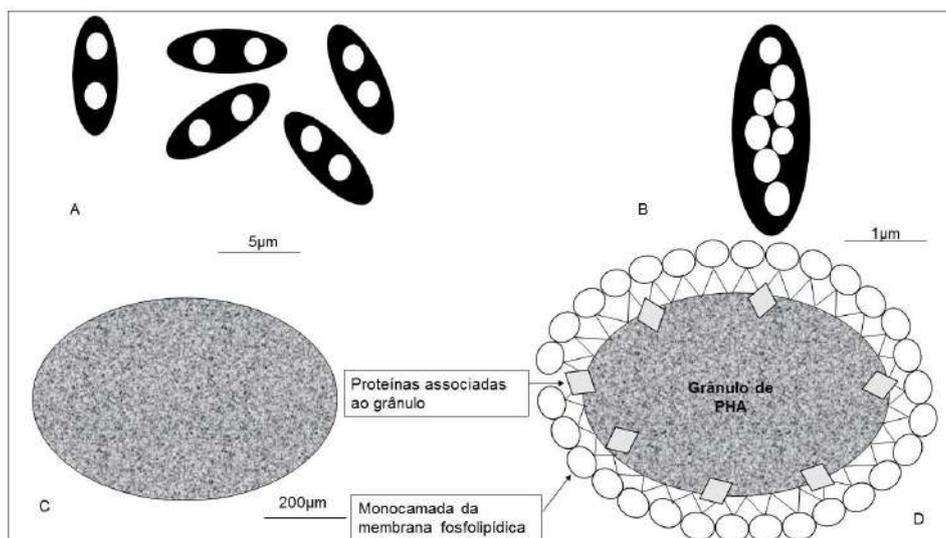


Figura 2. Representação da morfologia dos grânulos de PHA nas células bacterianas: A) observado em microscópio de contraste de fase; B) observado em microscópio de transmissão eletrônica; C) de força atômica mostrando a presença de partículas globulares na superfície dos grânulos; D) com uma monocamada de proteína de superfície.

Fonte. Adaptado de KUNASUNDARI; SUDESH, 2011.

Geralmente são acumulados 8 a 13 grânulos, que são constituídos de 98% de polímero e 2% de proteína e apresentam um diâmetro médio de 100-800nm, encontrando-se envolvidos por uma micela de 2-4nm de espessura, (POUTON; AKHTAR, 1996; KHANNA; SRIVASTANA, 2005). A Fig. 3 mostra esquematicamente o grânulo de PHA onde o centro, formado por PHA, é recoberto por uma camada lipídica integrada às proteínas. A camada de fosfolipídios tem seu lado hidrofóbico direcionado para o centro do grânulo.

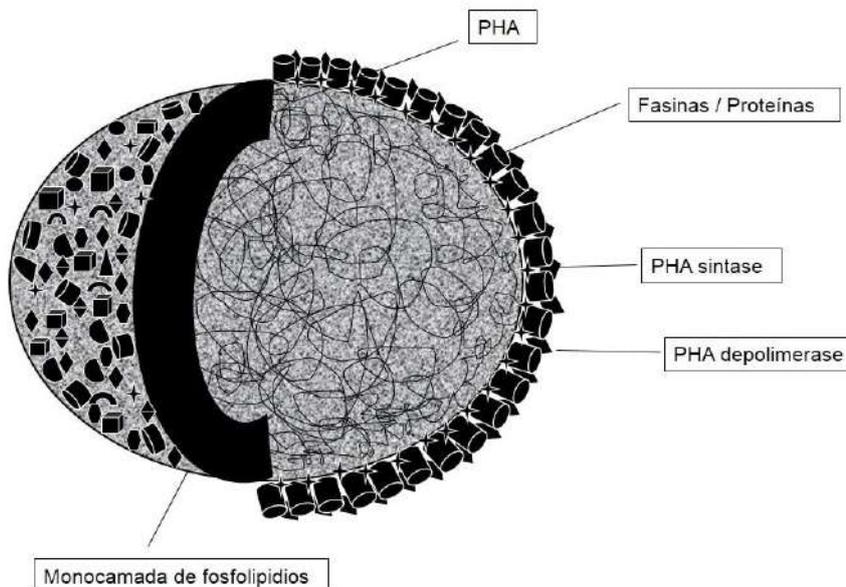


Figura 3. Representação esquemática do grânulo de PHA.

Fonte. Adaptado de ZINN et al., 2001.

1.4.2- Estrutura química dos PHAs

A classificação do PHA pode ser dividida em: polímeros constituídos de unidades monoméricas de hidroxiácidos (HA) com cinco carbonos ou menos, denominados de PHAs de cadeia lateral curta (PHA_{scl}), polímeros constituídos por unidades de HA contendo seis ou mais carbonos em sua composição, denominado de PHAs de cadeia lateral média (PHA_{mcl}) (RANSAY et al., 1994) e por fim, PHAs de cadeia lateral mais longa (PHA_{lcl}). Normalmente o PHA_{scl} apresenta uma característica de termoplaticidade enquanto o PHA_{mcl} apresenta semelhança com elastômeros (ZINN et al., 2001; SURIYAMONGKOL et al., 2007). A diferença entre os polímeros se dá pelo microrganismo utilizado, os substratos e suplementos oferecidos e as condições de cultivo (LEE, 1996a; REHM, 2003; STEINBÜCHEL; EVERSLOH, 2003; GURIEFF; LANT, 2007).

O grupo substituinte S pode variar de um a treze átomos de C, podendo conter insaturações, grupos aromáticos ou ligações com elementos de Cr, Cl ou F. Polímeros tipo PHA possui cadeias lineares, sendo que a polimerização ocorre devido à ligação entre o grupamento carboxila de um monômero e o grupamento hidroxila de outro, formando o poliéster (MADISON; HUISMAN, 1999; LUENGO et al., 2003). Na Fig. 4 observa-se a estrutura geral desses polímeros.

$\left[\begin{array}{c} \text{-O-CH-(CH}_2\text{)}_n\text{-C-} \\ \quad \quad \quad \\ \text{S} \quad \quad \quad \text{O} \end{array} \right]$		
100-3000		
n=1	S= Hidrogênio S= Metil S= Etil S= Propil S= Pentil S= Nonil	Poli(3- hidroxipropionato) Poli(3-hidroxibutirato) Poli(3-hidroxivalerato) Poli(3-hidroxihexanoato) Poli(3-hidroxioctanoato) Poli(3-hidroxidodecanoato)
n= 2	S= Hidrogênio S= Metil	Poli(4-hidroxibutirato) Poli(4-hidroxivalerato)
n= 3	S= Hidrogênio S= Metil	Poli(5-hidroxivalerato) Poli(5-hidroxihexanoato)
n= 4	S= Hexil	Poli(6-hidroxidodecanoato)

Figura 4. Estrutura geral dos PHAs.

Fonte. Adaptado de LEE, 1996.

1.4.3- Propriedades físicas e químicas dos PHAs

Os PHAs são termoplásticos e apresentam alto grau de polimerização, são cristalinos, opticamente ativos e insolúveis em água, conferindo propriedades plásticas que se comparam aos plásticos derivados de petróleo (REDDY et al., 2003; SOLAIMAN et al.,2008). A Tab. 2 mostra as propriedades dos PHAs, onde observam-se as características similares entre o P(3HB) e o Polipropileno (PP). O P(3HB) possui menor resistência a solventes, porém, apresenta maior resistência quando exposto à radiação ultravioleta (UV). Na forma de filmes, o P(3HB) tem como característica uma excelente propriedade de barreira a gás e são tão resistentes quanto os filmes de polipropileno, porém, não tão resistente quanto o polietilenotereftalato (PET) (HOLMES, 1985).

Tabela 2. Propriedades de diferentes PHAs comparados com diferentes polímeros petroquímicos.

Polímero	Temperatura de fusão(°C)	Módulo de Young (GPa)	Tensão de cisalhamento (MPa)	Resistência a ruptura (%)	Resistência ao impacto (Izod)(J/m)
P(3HB) ¹	179	3,5	40	5	50
P(3HB-co-3HV) ²					
3mol%3HV	170	2,9	38	-	60
9mol%3HV	162	1,9	37	-	95
14mol%3HV	150	1,5	35	-	120
20mol%3HV	145	1,2	32	-	200
25%mol%3HV	137	0,7	30	-	400
P(4HB) ³	53	140	104	1000	-
P(3HB-co-4HB) ⁴					
3mol%4HB	166	-	28	45	-
10mol%4HB	159	-	24	242	-
16mol%4HB	-	-	26	444	-
64mol%4HB	50	30	17	591	-
90mol%4HB	50	100	65	1080	-
P(4HHx-co-3HO) ⁵	61	-	10	300	-
PP	170	1,7	34,5	400	45
PET	262	2,2	56	7300	3400
PS	110	3,1	50	-	21

Legenda: ¹⁻ Poli (3- hidroxibutirato); ²⁻ Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxicaprolato); ³⁻ Poli(3-hidroxicaprolato); ⁴⁻ Poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato); ⁵⁻ Poli(3-hidroxi-hexanoato-co-3-hidroxi-octanoato) PP- Polipropileno; PET- Polietilenotereftalato; PS- Poliestireno

Fonte. Adaptado de LEE, 1996a

A resistência a ruptura do P(3HB) é muito inferior à do PP, porém, essa propriedade pode ser melhorada com a adição de um copolímero como por exemplo, 4-hidroxibutirato (4HB) ao P(3HB). Um ponto desfavorável ao P(3HB), encontra-se em sua temperatura de degradação térmica, próxima aos 200°C, sendo essa muito próxima à temperatura de fusão. O decréscimo da temperatura de fusão, pode ser melhorada com a fração de 3HV, sem afetar a temperatura de degradação, no qual resultará em um melhor processamento térmico do copolímero. Além disso, o aumento da fração de 3HV torna o polímero mais flexível, pelo decréscimo do Módulo de Young, aumentando a sua resistência ao impacto. Com isso, as propriedades do P(3HB-co-3HV)

podem ser controladas pelo ajuste da fração de 3HV durante a cultura em biorreator (LEE, 1996a).

1.4.4– Síntese de PHAs

Sua síntese ocorre da seguinte forma: primeiramente, há uma fase de crescimento não limitado com o objetivo de crescimento celular, seguida da produção do polímero e seu acúmulo, que ocorre somente em condições de limitação de algum nutriente essencial como P, Fe, Mg, N e O com excesso de carbono (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005). Nessas condições o microrganismo irá crescer e multiplicar-se rapidamente até o consumo total de carbono inicial e até o esgotamento dos nutrientes essenciais. Na ausência de um destes, o crescimento celular é limitado e o carbono que foi adicionado será convertido em PHA (CALVÃO, 2009).

Os microrganismos são capazes de produzir monômeros de PHA a partir da utilização de várias fontes de carbono. Muitas vias metabólicas são propostas para a produção desses monômeros. As vias de biossíntese para a obtenção de PHA podem ser baseadas na composição monomérica: o primeiro grupo se refere a síntese de PHA_{scl}, já o segundo grupo é representado pela síntese de PHA_{mcl}. A maior parte dos procariotos sintetiza P(3HB) o principal representante do PHA_{scl}, e os PHA_{mcl} são o segundo tipo mais frequente de PHAs detectados. O (R)-3-hidroxiacetil-CoA serve de substrato para a PHA sintase (codificado por *phaC*) sendo o precursor direto para a síntese de P(3HB). Os PHA_{mcl} são sintetizados pela conversão de intermediários do metabolismo dos ácidos graxos a (R)-3-hidroxiacetil-CoA (REHM, 2006). A Fig. 5 mostra as rotas metabólicas para a síntese de PHA.

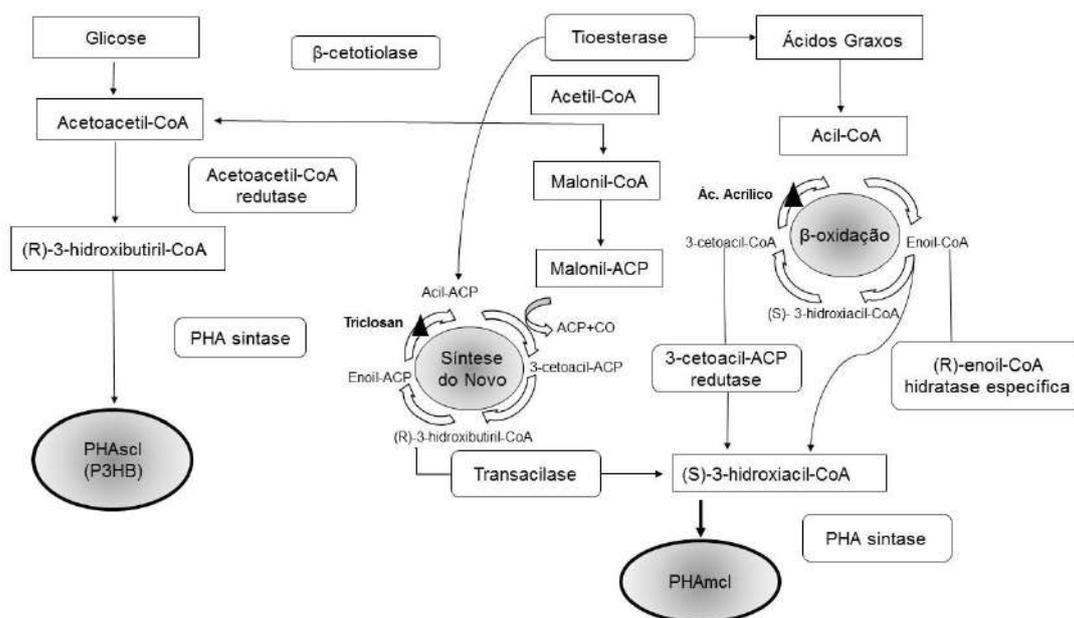


Figura 5. Esquema de rotas metabólicas para síntese de PHA.

Fonte. Adaptado de REHM, 2006

Para a obtenção da síntese de PHA, são necessárias 3 fases metabólicas: primeiramente, uma fonte de carbono disponível para que ocorra a síntese através de um sistema local de transporte da membrana citoplasmática ou pela difusão do composto para a célula. Em seguida, as reações anabólicas ou catabólicas (até mesmo ambas), convertem o composto em hidroxiacil coenzima A tio éster, que serve como substrato para a PHA sintase, também chamada de PHA polimerase. Na terceira fase, a PHA sintase que é a enzima chave para a síntese de PHAs, catalisa a formação das ligações ésteres com a liberação da coenzima A (STEINBÜCHEL; VELENTIN, 1995). A Fig. 6 indica as fases metabólicas para a obtenção do PHA.

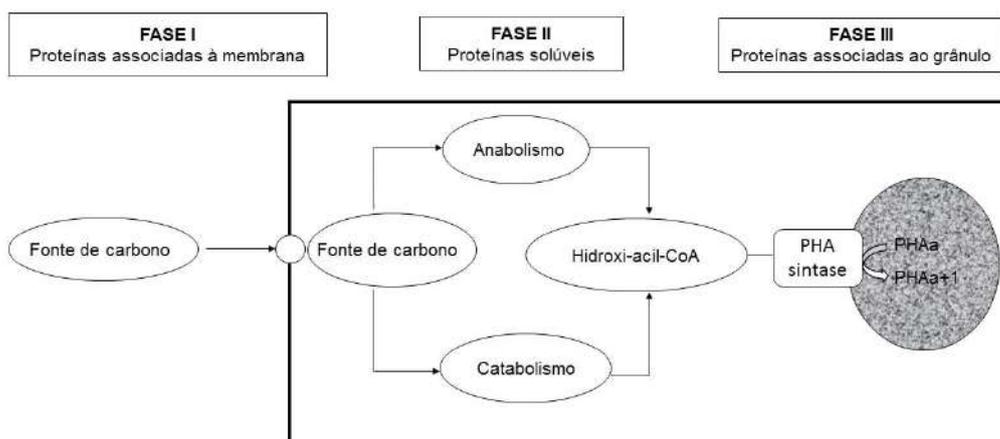


Figura 6. Fase da biossíntese de PHA.

Fonte. Adaptado de STEINBÜCHEL; VELENTIN, 1995.

1.4.5– Produção de PHAs

Os PHAs podem ser produzidos por quatro diferentes métodos: i) produção química, ii) produção biotecnológica, como por exemplo: culturas de vários tipos de bactérias, culturas com linhagem de mutantes, culturas com bactérias e leveduras recombinantes, plantas transgênicas, entre outros, iii) combinação da produção biotecnológica e química, semi-síntese através da polimerização química do ácido láctico pela fermentação, iv) isolamento de fontes naturais (STEINBÜCHEL; FÜCHTENBUSCH, 1998). A Fig. 7 representa o esquema fechado de produção de PHAs. Uma cultura de cana-de-açúcar usa a luz solar através da fotossíntese para converter os compostos CO₂ e H₂O em carboidratos que, em sua forma de açúcares simples, fornecem matéria-prima necessária para a produção do biopolímero. O microrganismo específico acumulador de PHA, é utilizado para a produção, usando como fonte de carboidrato o açúcar, transformando-o em polímero que, por sua vez, é extraído e processado em produtos plásticos. Embora os PHAs sejam estáveis em uso normal, quando depositados em meio microbiologicamente ativo são metabolizados enzimaticamente. Em condições aeróbicas, produz-se novamente CO₂ e H₂O, concluindo o ciclo (GARCIA, 2006). Em condições aeróbicas, o resultado da degradação são os compostos de dióxido de carbono

(CO₂) e água (H₂O), enquanto que em condições anaeróbicas, são produzidos ao fim do processo, CO₂ e metano (CH₄) (REDDY et al., 2003).

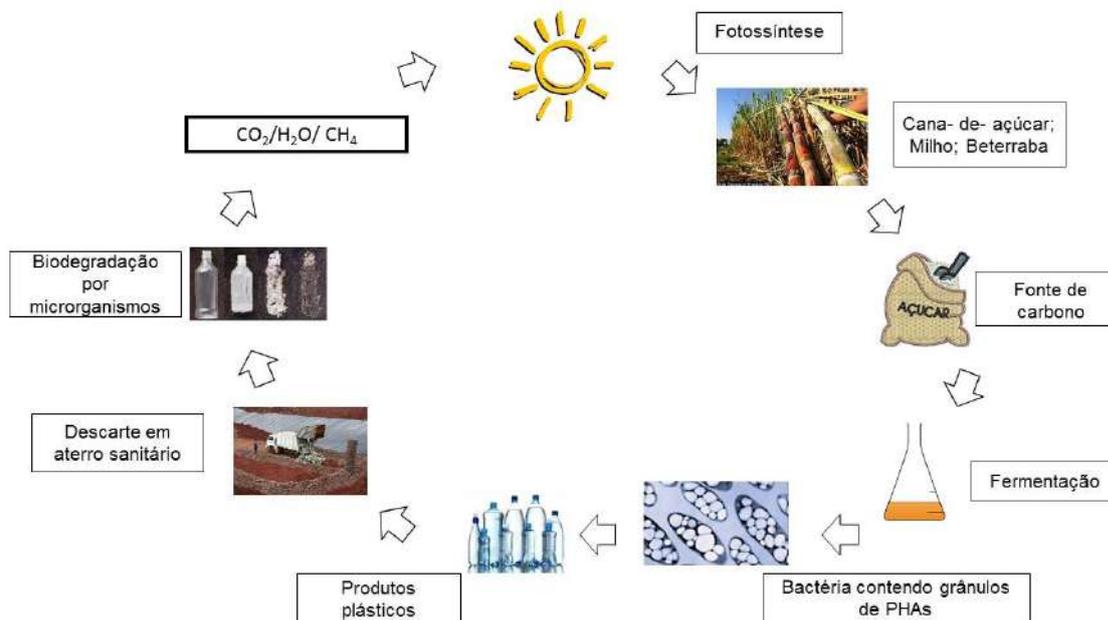


Figura 7. Ciclo fechado para a produção e degradação de PHA.

Fonte. Adaptado de GARCIA, 2006.

1.4.6– Recuperação dos PHAs

Por ter a característica de formação, o acúmulo de corpos de inclusão intracelulares, são necessários os processos de extração e purificação dos biopolímeros bem como o rompimento celular e a eliminação de resíduos celulares por meio de solventes e outros produtos químicos. Essas etapas, conhecidas como *“downstream”* contribuem significativamente para que o processo se torne dispendioso (OLIVEIRA et al., 2004). A redução do capital investido depende de linhagens com elevada capacidade de converter o substrato no produto desejado, além do desenvolvimento de um processo fermentativo que possa permitir grande crescimento celular e que os processos de extração e purificação sejam de menor custo possível, entre outros fatores (GOMES; NETO, 1997).

Na produção de PHA, o processo de extração do polímero é uma etapa muito importante, uma vez que o polímero a ser usado se encontra no interior da célula. Diversos métodos são empregados para se obter a extração, podendo ser utilizados métodos químicos, mecânicos ou até mesmo a fusão

desses. Dentre os métodos de separação da biomassa celular, destacam-se os de extração por solvente, digestão da biomassa, rompimento celular por ação mecânica, extração com fluidos supercríticos e liberação espontânea (FACCIN, 2012).

O método mais empregado é o de extração com solvente. Através desse processo ocorre a permeação do solvente na parede celular e desestruturação da mesma, causando a solubilização do polímero que se encontra no citosol. Como principais solventes para esse processo, temos: clorofórmio, dicloroetano, carbonato de propileno, carbonato de etileno, álcoois contendo de 4-10 carbonos, ésteres, cetonas, entre outros (RAMSAY et al., 1994; KESSLER et al., 2001; POSADA et al., 2001).

O uso desses solventes pode trazer uma alta pureza ao material formado (<99%), porém, devido à característica de alta viscosidade atribuída aos PHAs, torna-se necessário volumes elevados de solventes tóxicos e/ou voláteis (aproximadamente 20 partes de solvente para 1 parte de polímero), causando aumento do custo da produção e riscos de danos ao meio ambiente (LEE, 1996a).

1.4.7– Degradabilidade

Uma característica importante do PHA é sua biodegradabilidade. Na natureza, muitos microrganismos podem degradar os PHAs por ação das enzimas PHA hidrolase e depolimerases, tendo como função a degradação do polímero que se encontra no interior das células para a utilização como fonte de carbono. Porém, estas enzimas não são capazes de degradar o polímero externo, ou seja, retirado da célula, possivelmente devido à mudança do estado cristalino para o estado amorfo. Muitos microrganismos que são encontrados em solos, águas marinhas e lagos, possuem uma PHA depolimerase extracelular que é capaz de degradar o polímero após sua retirada da célula, utilizando-o como fonte de carbono. A habilidade de degradação de PHA não está apenas restrita a bactérias, muitos fungos também são capazes de degradar esses biopolímeros (JENDROSSEK et al., 1996; MERRICK et al., 1999; SUDESH et al., 2000). A atividade dessas enzimas pode variar e depende da composição do polímero, forma física, dimensões das amostras e condições ambientais (MADISON; HUISMAN, 1999).

O processo de degradação polimérica é caracterizado pela deterioração das propriedades do polímero através da clivagem das cadeias poliméricas para a formação de oligômeros e, posteriormente, monômeros (GOPFERICH, 1996). A biodegradação dos polímeros ocorre por dois mecanismos que dependem da natureza do polímero e do ambiente. O primeiro mecanismo é a hidrólise biótica e abiótica, seguida pela bioassimilação (hidrobiodegradação), que é um processo primário envolvido na biodegradação das heterocadeias poliméricas tais como a celulose, o amido e poliésteres alifáticos, dos quais o PHA e o PLA são típicos. O segundo, trata-se da peroxidação seguida pela bioassimilação de produtos com baixa massa molar (oxobiodegradação), comum às cadeias de carbono de polímeros (SCOTT, 2000).

A velocidade da biodegradação de PHAs é influenciada por fatores diversos, alguns relacionados ao ambiente (temperatura, umidade, pH e disponibilidade de nutrientes) e outros relacionados ao biopolímero (composição, cristalinidade, aditivos incorporados, espessura e área superficial). A biodegradação ocorre na superfície por hidrólise enzimática (SUDESH et al., 2000). Entre os meios propostos como inoculantes para a degradação de PHA pode-se citar: lodo ativado, solo orgânico (GARCIA, 2006).

1.4.8– Mercado e Produtos obtidos com PHAs

Por serem considerados biodegradáveis, termoprocessáveis e em geral biocompatíveis, os PHAs tornaram-se atrativos como biomateriais podendo ser utilizados em aparatos médicos como por exemplo, suturas, na engenharia de tecidos (MARTIN; WILLANS, 2003; VALLAPPIL et al., 2006). Também são empregados na forma de filmes biodegradáveis com utilização diversas na agricultura, além de servirem como uma camada protetora para fertilizantes, herbicidas e inseticidas. Porém, por serem compatíveis com inúmeros alimentos, suas principais aplicações são em blendas na área de embalagens para substituir os plásticos petroquímicos, como em produtos lácteos, bebidas e produtos cárneos (WILLIANS et al., 1999; SORRENTINO et al., 2007).

O alto custo da produção dos PHAs em geral ainda é um entrave na sua comercialização, mas já existem empresas produzindo esses biopolímeros em diversos países (Tab. 3, pg. 33), como por exemplo: Estados

Unidos, Brasil, Japão e Itália. Em alguns dos casos, a produção é feita em escala piloto, mas há um crescente interesse no aumento desta escala (TIAN et al., 2009).

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

O PHA mais estudado e caracterizado até hoje é o P(3HB), sendo este um polímero alifático natural e biodegradável tipo homopolímero, que é composto por cadeias monoméricas de quatro átomos de carbonos (TSUGE, 2002). Solúvel em alguns solventes orgânicos e insolúvel em água (STEINBÜCHEL; FÜCHTENBUSCH, 1998), tem como fórmula química $(C_4H_6O_2)_n$, possuindo 55,81% de carbono, 7,03% de hidrogênio e 37,16% de oxigênio em massa (DAWES; SENIOR, 1973).

O interesse industrial pela sua utilização iniciou-se na década de 60 quando foram descritas suas primeiras propriedades termoplásticas (GOMEZ et al., 1997). Sua síntese foi constatada pela primeira vez em 1971, e ficou conhecido como Poli(3-hidroxi-butirato), com o resultado de um polímero parcialmente estereoregular, opticamente inativo e obtido pela polimerização de uma mistura racêmica de β -butirolactona utilizando um sistema catalítico de trietilalumínio e água. Em outras tentativas, obtiveram um P(3HB) de origem bacteriana com baixa massa molar e cristalinidade (DAWES; SENIOR, 1973; BLOEMBERGEN et al., 1989).

No Brasil, o P(3HB) foi até recentemente produzido pela empresa PHB S.A, sob a marca BIOCYCLE®. A empresa, localizada em Serrana- SP, possui parceria com o Instituto de Pesquisa Tecnológica, da COPERSUCAR e da Universidade de São Paulo e utilizava na sua planta piloto o microrganismo *Ralstonia eutropha*, geneticamente modificada, para o uso da sacarose como fonte de carbono (SQUIO, 2004; VELHO, 2006). A empresa que projetava uma capacidade de 10.000t/ano para 2020, cessou suas atividades de produção de P(3HB) em meados de 2015. Na Tab. 3, pode-se observar a produção industrial de P(3HB) e seus copolímeros por diversas empresas.

Tabela 3. Produção a nível mundial de P(3HB.)

Empresa	País	Nome comercial	PHAs	Escala de produção	Capacidade (2007)	Capacidade futura (2020)	Referência
Tianan ¹	China	Enmat	P(3HB-co-3HV)	I	2.000 t/ano	50.000 t/ano	
Telles ¹	EUA	Mirel	Copolímeros de P(3HB)	I	250 t/ano	500.000 t/ano	
Kaneka ¹	Japão	Kaneka PHBH	P(3HB-co-3HHx)	PI e I	100t/ano	50.000 t/ano	
Green Bio- DSM ¹	China	Green Bio	P(3HB-co-4HB)	PI e I	-	-	
Biomers ¹	Alemanha	Biomer	P(3HB)	Pq e PI	10t/ano	-	European Bioplastics e European Polysaccharide Network of Excellence SHEN, et. al., 2009 (adaptada) ¹ ;
Mitsubishi Gas Chemical ¹	Japão	Biogreen	P(3HB)	Pq e PI	-	-	BIO-ON, 2014 ² ;
Biomatera ¹	Canadá	Biomatera	P(3HB-co-3HV)	Pq e PI	-	-	BIOPLASTIC NEWS, 2010 ³
Meredian ¹	EUA	Meridian PHA	-	I	-	272.000 t/ano	
Tepha ¹	EUA	Tepha Flex, TephElast	-	Pq e PI	-	-	
Tianzhu ¹	China	PHBH	P(3HB-co-3HHx)	Pq e PI	-	-	
Bi-on ³	Itália	Minerv-PHA	-	-	-	-	
PHB Industrial ⁴	Brasil	Biocycle	P(3HB) e P(3HB-co-3HV)	Pq, PI e I	50t/ano	10.000 t/ano Desativada em 2015	

Legenda: I: Industrial; PI: Piloto; Pq: Pesquisa

1.5.1- Propriedades físicas e químicas do P(3HB)

Possuindo interessantes propriedades termoplásticas, o P(3HB) pode ser processado como os termoplásticos clássicos, resistindo à uma ampla faixa de temperatura de -30 °C até 120 °C em sua forma original (SHEN et al., 2009). O P(3HB) não é tóxico, sendo que degradação produz ácido 3-hidróxidobutírico, constituinte normal do sangue humano mesmo em concentrações elevadas, sendo assim, pode ser utilizado em produtos que venham a ter contato com tecido humano ou alimentação animal e humana (ASRAR; HILL, 2002; BIOMER, 2015).

Comparando as suas propriedades com o polipropileno, pode-se perceber semelhanças como a elevada temperatura de fusão, tensão de cisalhamento e cristalinidade elevada; porém, possui a resistência à ruptura menor (NODA et al., 2004), resultando em um material quebradiço devido a sua baixa estabilidade térmica e por ser um material rígido (Tabela 4) (LEE, 1996a; MADISON; HUISMAN, 1999; SUDESH et al., 2000; OJUMU et al., 2004). Assim como o PP, o P(3HB) é insolúvel em água e possui relativa degradação hidrolítica, diferenciando-o da maioria dos polímeros biodegradáveis atualmente disponíveis que são sensíveis a luz, à umidade ou solúveis em água. Possui excelente resistência a solventes, além de uma boa resistência a óleos e gorduras, raios UV, porém, com baixa resistência a ácidos e álcalis. Comparando com o PP, sua densidade é maior e a permeabilidade ao oxigênio é muito baixa, resultando em um material adequado para ser utilizado em embalagens que tenham como característica a sensibilidade ao oxigênio (SHEN et al., 2009).

Tabela 4. Comparação entre as características do P(3HB) e do polipropileno (PP).

Características	P(3HB)	PP	Referência
Temperatura de fusão	180°C (1)	174°C (1)	
Temperatura de transição vítrea	5°C (1)	-17°C (1)	
Temperatura de degradação	220°C (2)	445°C (3)	GOMEZ; BUENO NETTO, 1997 (1)
Densidade	1,18-1,25g.cm ⁻³ (1)	0,91g.cm ⁻³ (1)	
Cristalinidade	70% (1)	68% (1)	
Permeabilidade de O ₂	45cm ³ .m ⁻² . at ⁻¹ . dia ⁻¹ (1)	1700cm ³ .m ⁻² . at ⁻¹ . dia ⁻¹ (1)	DUARTE, 2004 (2)
Módulo de elasticidade	3500MPa (1)	1700MPa (1)	
Tensão de cisalhamento	40MPa (1)	38MPa (1)	ROSA, 2007 (3)
Resistência à ruptura	5% (1)	400% (1)	
Massa molar	1-1.10 ⁵ g.mol ⁻¹ (1)	2,2-7. 10 ⁵ g.mol ⁻¹ (1)	

Astar e Gruys (2002), ao estudarem a temperatura de degradação térmica do P(3HB), observaram que acima da temperatura de fusão cristalina (T_m) (190 °C e 170 °C) liberam um odor característico, denominado de “ácido crotônico” (*trans*-2-butenóico). Já Duarte (2004) relata que ao estudar as condições ótimas referentes ao processamento do P(3HB), pode observar que quando o polímero é submetido ao aquecimento de 200 °C por um período de 2h, não sofre degradação térmica, porém, este fenômeno pôde ser visto de maneira expressiva quando submetido a temperatura a partir de 220 °C.

A temperatura de transição vítrea (T_g) está relacionada à região amorfa dos polímeros e representa a temperatura em que a mobilidade das cadeias moleculares presente no polímero se torna restrita pela coesão intermolecular. Nas temperaturas acima da T_g as cadeias poliméricas podem adquirir suficiente mobilidade para que a cristalização tenha seu início, porém, em temperaturas abaixo da T_g , o material não possui energia interna suficiente para o seu deslocamento de uma cadeia com relação à outra, e com isso, as mobilidades das cadeias macromoleculares desaparecem, resultando em um material rígido (CANEVAROLO, 2002; SOUZA et al., 2004).

Os valores de T_g dos dois polímeros indicam que o PP é mais flexível que o P(3HB), pois possui um T_g de -17 °C enquanto o de P(3HB) é de 5 °C. Essa maior flexibilidade é confirmada através do módulo de elasticidade (módulo de Yong ou simplesmente módulo) do PP (1700MPa), que é inferior se comparado com P(3HB) que é de 3500MPa. O módulo de elasticidade de um polímero está diretamente relacionado com a rigidez ou flexibilidade, de forma que, quanto mais alto, maior a rigidez do polímero. Porém, ambos os polímeros apresentam alto grau de cristalinidade (FORMOLO et al., 2003).

A resistência à ruptura do P(3HB) (5%) é muito menor do que a de plástico convencional (400%), já as tensões de cisalhamento desses polímeros são similares. A alta massa molar é uma característica desejável para aplicações industriais. O polímero o qual apresenta essa característica, é um material muito útil para a preparação de filmes e fibras fortes por extração quente ou fria (AGUS et al., 2006). A massa molar dos PHAs pode ser reduzida durante o seu processamento (BOURQUE et al., 1995), e esta diminuição pode

ocorrer também durante o processo de extração da biomassa (LAFFERTY et al., 1988).

Diferentemente do PP, o P(3HB) possui elevada densidade e baixa permeabilidade ao oxigênio. Sua elevada densidade, apesar de negativa sob alguns aspectos, como a relação ao transporte, é favorável sob aspecto ambiental, visto que, além de biodegradável, possui uma rápida tendência à submersão, o que dificulta a ingestão de seus fragmentos por animais marinhos, por exemplo. A reduzida permeabilidade ao oxigênio, aliada à elevada resistência à água e à radiação ultravioleta tornam o P(3HB) adequado para ser utilizado na confecção de embalagens alimentícias (GROTHER et al., 1999).

1.5.2 – Metabolismo para a produção do P(3HB)

O metabolismo dos microrganismos é direcionado de acordo com o meio no qual encontram-se cultivados. Considerando um crescimento balanceado, o microrganismo utilizará o substrato como fonte de energia e/ou para sua manutenção/formação de material celular. Porém, quando existe limitação de nutrientes essenciais e excesso de carbono no meio, o substrato carbônico é utilizado para formação de biopolímeros, estocados como reserva de energia na célula (Figura 8) (KRUGER, 2009).

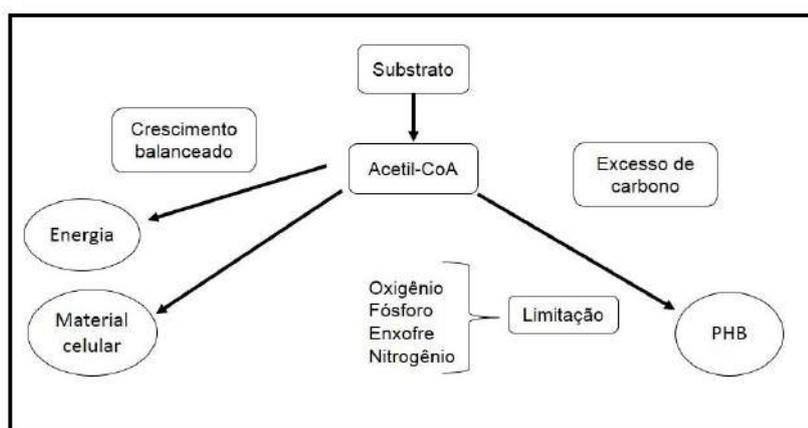


Figura 8. Metabolismo balanceado e condição de limitação de nutrientes e excesso de carbono.

Fonte. Adaptado de BYROM, 1987.

Para a síntese de P(3HB) são necessárias três reações catalisadas enzimaticamente (Figura 9). A primeira reação consiste na condensação de duas moléculas de acetil coenzima-A (acetil-CoA) em acetoacetil-CoA, catalisada pela enzima β -cetotiolase (codificada pelo gene *phbA*). A segunda reação se dá pela redução de acetoacetil-CoA em hidroxibutiril-CoA, catalisada por uma enzima NADPH-dependente: acetoacetil-CoA redutase (codificada pelo gene *phbB*). E por fim, monômeros de hidroxibutiril-CoA são polimerizados em P(3HB) pela PHB polimerase, codificada pelo gene *phbC* (REDDY et al., 2003).

O mecanismo de ação da enzima β -cetotiolase envolve duas reações parciais, em que dois resíduos de cisteína fazem parte do sítio ativo dessas enzimas e são responsáveis pela ligação da primeira molécula de acetil-CoA à enzima e pela ativação da segunda molécula de acetil-CoA, ocorrendo a condensação e formação de acetoacetil-CoA (MADISON; HUISMAN, 1999). A enzima acetoacetil-CoA redutase catalisa a redução de acetil-CoA para D(-)-3-hidroxiacil-CoA e, apesar de existir dois tipos, apenas a dependente de NADPH é envolvida na síntese do polímero, pois ela realiza a ativação somente dos substratos de cadeia C₄ a C₆ D(-)-3-hidroxiacil-CoA (STEINBÜCHEL et al., 1993).

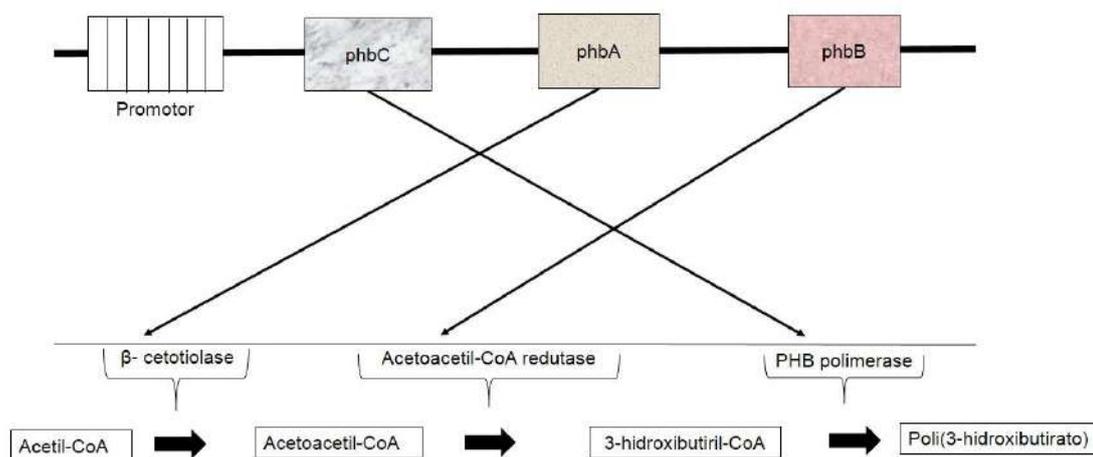


Figura 9. Via de síntese de Poli(3-hidroxiacetil-CoA).

Fonte. Adaptado de MADISON; HUISMAN, 1999.

A PHB polimerase é considerada a enzima chave para o acúmulo de P(3HB), devido ao fato de que ela realiza a catálise, que é o passo principal da via, a polimerização de unidades de D(-)-3-hidroxiacetil-CoA, formando o

polímero. Essa enzima apresenta 4 classificações que difere de acordo com a especificidade ao substrato e a composição de subunidades enzimáticas (KRUGER, 2009). A Tab. 5 mostra as diferenças entre as PHB polimerases.

Tabela 5. Características das diferentes PHB polimerases.

Tipo de PHB polimerase	Subunidades	Substrato	Exemplos de microrganismos	Referências
I	PhaC (61-73KDa)	Monômeros de cadeia curta (C ₃ -C ₅)	<i>C. necator</i>	SLATER et al., 1988
II	PhaC (61-73KDa)	Monômeros de cadeia média (C ₆ -C ₁₄)	<i>P. oleovorans</i> e <i>P. aeruginosa</i>	HUISMAN et al., 1999
III	PhaC (40KDa) PhaE (40KDa)	Monômeros de cadeia curta (C ₃ -C ₅)	<i>Allchoromatium vinosum</i> e <i>Thiocapsa violácea</i>	LIEBERGE-SELL et. al., 2000
IV	PhaC (40KDa) PhaR (20KDa)	Monômeros de cadeia curta (C ₃ -C ₅)	<i>Bacillus megaterium</i>	MCCOOL; CANNON, 2001

Fonte. Adaptado de KRUGER, 2009.

Um dos intermediários para a síntese de P(3HB) é a acetil-CoA, que é necessária para a síntese de monômero (R)-3-hidroxiacetil-CoA (3HB-CoA). Porém, essa molécula é também o composto chave para o metabolismo celular, sendo oxidada através do ciclo tricarboxílico (TCA) também conhecido como ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs. Acetil-CoA, intermediário central no metabolismo de todos os compostos de carbono, pode ser usado para gerar energia biologicamente útil ou utilizado no crescimento e multiplicação (BABEL, et. al.; 2001). Na Fig. 10 pode-se observar um esquema de possíveis rotas metabólicas para a obtenção do P(3HB) e de biomassa por glicerol ou glicose. Em relação a metabolização pela glicose, é possível utilizar a via Embden-Meyerhof-Parns (EMP), também conhecida como glicólise ou via glicolítica e pela via de Entner-Doudoroff (EDP). Outra via que é possível ser metabolizada é a via pentose fosfato (TYO, et. al., 2010).

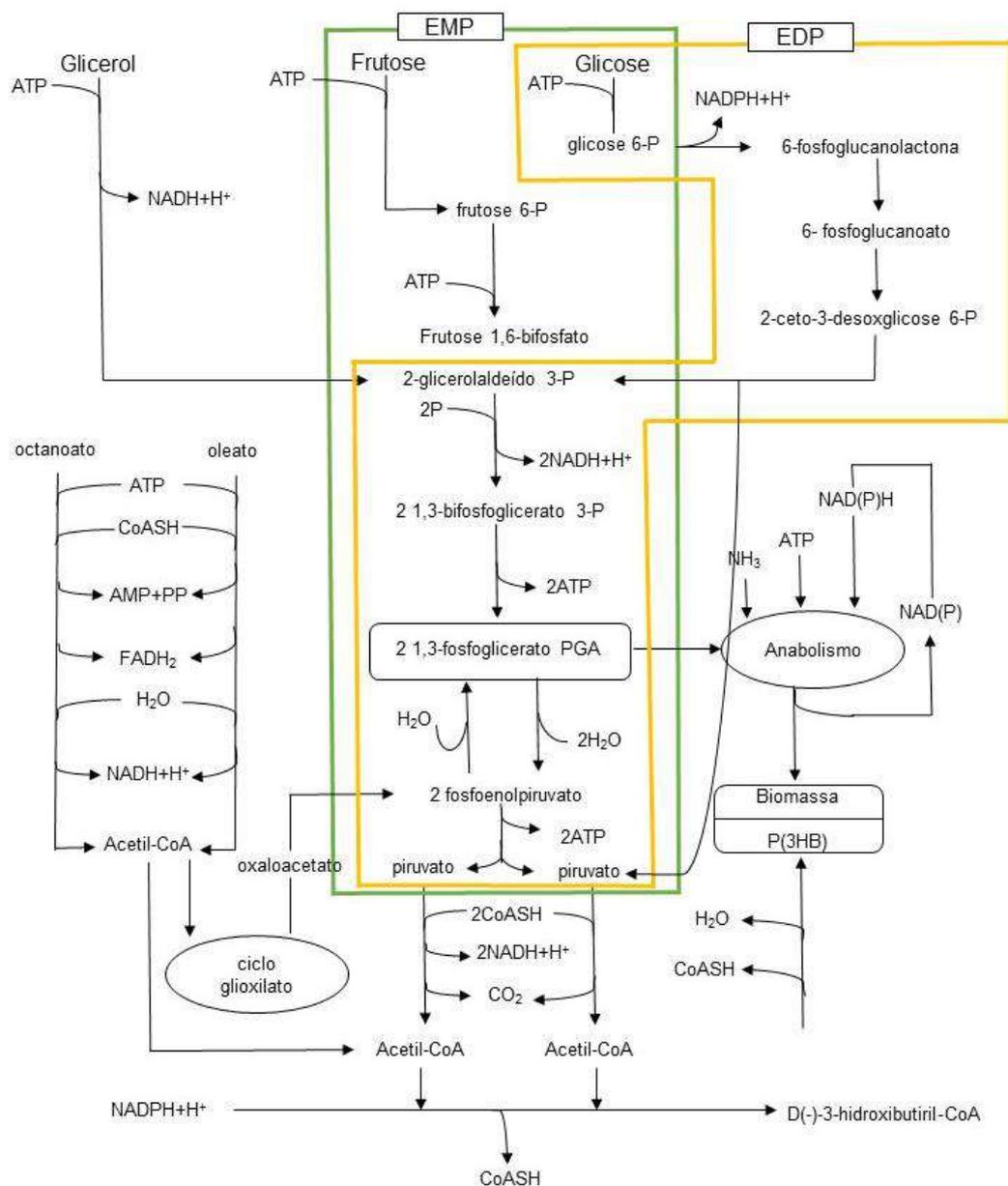


Figura 10. Esquema das principais rotas metabólicas de síntese de biomassa residual e P(3HB) a partir de diferentes fontes de carbono.

EMP: Embden- Meyerholf- Parns. EDP: Entner- Doudoroff.

Fonte. Adaptado de BORMANN, 2000.

A síntese de P(3HB) é favorecida quando há uma grande quantidade de Acetil-CoA e NADPH e uma baixa concentração de Coenzima A livre (DAWES; SENIOR, 1973). Tyo, et. al (2010) mostraram que para a *E. coli* recombinante, a enzima acetoacetil coenzima A redutase NADPH dependente (PhaB) é responsável pelo controle da rota metabólica para a produção de P(3HB). O cofator NADPH consumido na reação da condensação de 2 acetil-CoA necessita

ser regenerado em alguma outra rota metabólica para que a síntese de P(3HB) continue (YAMANE, 1993).

1.5.3- Produção do P(3HB)

A síntese de P(3HB) ocorre da seguinte forma: primeiramente há uma fase de crescimento não limitado, com o objetivo de crescimento celular, seguida da produção do polímero e seu acúmulo, que ocorre somente em condições de limitação de algum nutriente essencial como P, Fe, Mg, N com excesso de carbono (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005). Nessas condições, o microrganismo cresce e multiplica-se rapidamente até o consumo total de carbono inicial e esgotamento dos nutrientes essenciais, na ausência de um destes, o crescimento celular é limitado e o carbono que foi adicionado será convertido em PHA (CALVÃO, 2009). A Fig. 11, mostra o fluxograma do processo de produção do P(3HB). Através de uma cultura pura e sua incubação em um volume de meio V1 é obtido o pré-inóculo e, após um determinado tempo, o volume V1 é transferido para um volume maior (V2) e assim sucessivamente até obter o volume V5 que corresponde ao inóculo final, em seguida, o inóculo produzido é transferido para um biorreator que encontra-se com o ar comprimido e meio de cultura esterilizado para assim dar início ao processo de produção do bioplástico. Para a fase de recuperação do polímero, o meio de cultura sofre uma centrifugação ou filtração e o *pellet*, por sua vez, é extraído por um solvente orgânico, e finalmente os resíduos celulares serão descartados e a fase orgânica é evaporada, tendo como resultado o P(3HB). Após sua formação, pode ser aplicado em diferentes materiais como por exemplo: cápsulas de remédio, objetos plásticos em geral, *scaffolds*, fios de sutura, próteses dentárias, entre outros.

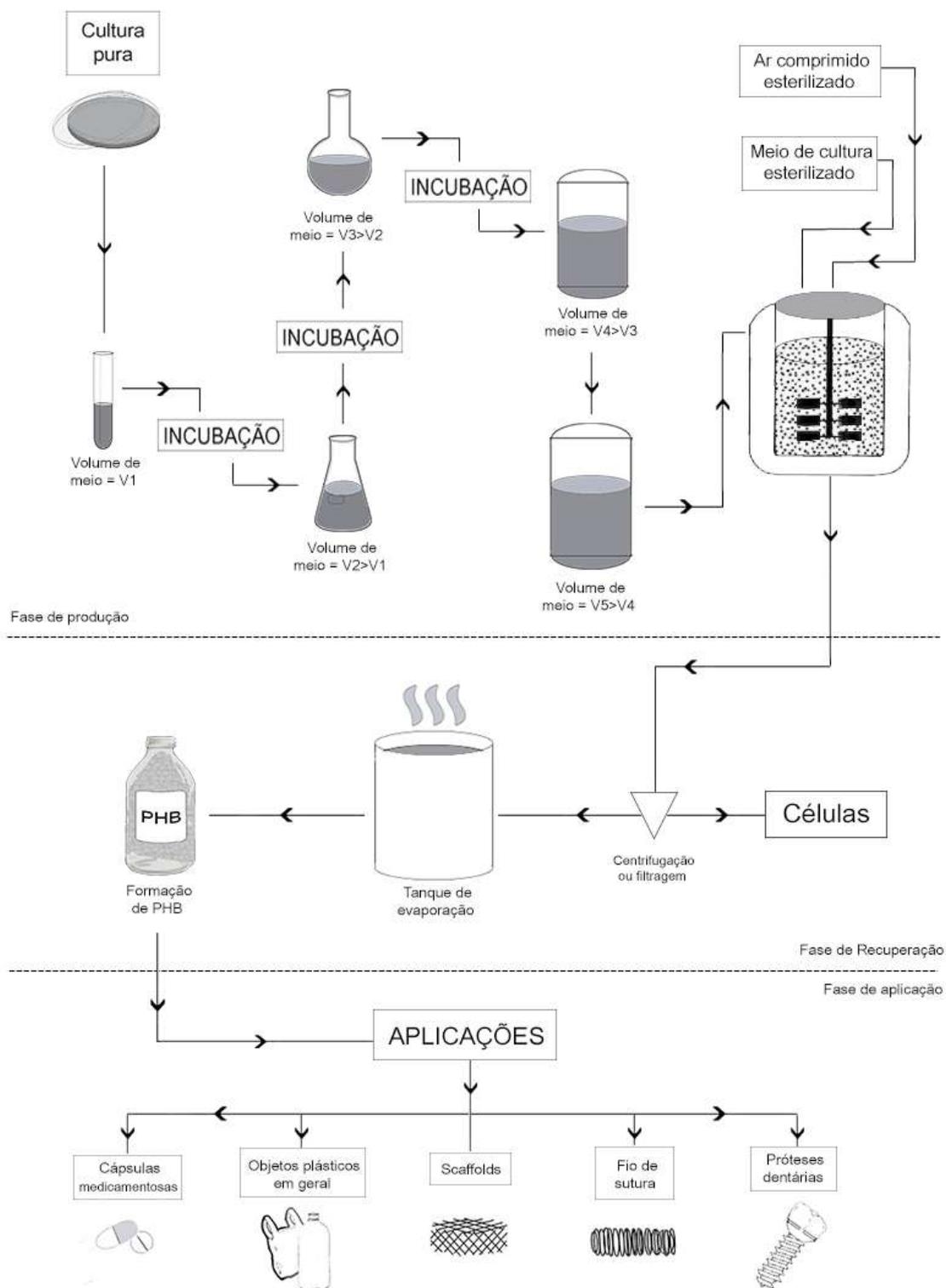


Figura 11. Processo de produção de P(3HB) com suas fases de produção, recuperação e sua aplicabilidade.

Fonte. Autor, 2016.

1.6- Microrganismos produtores de PHA

Bactérias Gram positivas e negativas têm a capacidade de acumular PHAs, podendo ser encontradas em diversos locais na natureza, como solo, água do mar, efluentes, entre outros (BYROM, 1987). Podem ser encontrados na literatura mais de 300 microrganismos capazes de sintetizar PHAs, porém, somente uma pequena parte é empregada no desenvolvimento de processos produtivos incluindo, *Ralstonia sp.*, *Azotobacter vinelandii*, *Alcaligenes latus*, *Cupriavidus necator* nativo e recombinante, *Escherichia coli* recombinante, *Alcaligenes eutrophus*, *Protomonas extroquens*, *Chromobacterium violaceum* (LEE, 1996b) e *Pseudomonas sp.* (CROCHEMORE, 2012). Em condições de desenvolvimento normais, a maioria das bactérias acumula uma pequena porcentagem de PHA (1 a 15%), porém, em condições especiais de crescimento e com estratégias de fermentação, podem alcançar altos valores (próximo a 90%) de sua massa celular seca (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005).

Com isso, a seleção do microrganismo para produção industrial de PHA é baseada em vários fatores, como alta velocidade de crescimento, utilização de diferentes substratos, principalmente de baixo custo, capacidade de acumular grande quantidade de polímero (ao menos 60% da massa celular seca) e elevado fator de conversão do substrato em biopolímero (LEE, 1996a; RAMSAY et al., 1990). Na produção industrial é exigido que as linhagens de microrganismos com o máximo de características associadas a produção, como rápido crescimento em fontes de carbono de baixo custo, porcentagem alta de PHA, eficiência na transformação do substrato em produto, adaptação e extração do polímero pelas células bacterianas, além de ser inofensivo aos seres humanos e ao meio ambiente. Além disso, a linhagem bacteriana utilizada para a produção do polímero deve apresentar baixa demanda de oxigênio (CHEN, 2003).

Os microrganismos usados para a produção de PHAs podem ser divididos em dois grupos. O primeiro grupo (I) é caracterizado por produzir o polímero quando em excesso de carbono e o seu crescimento é interrompido ou reduzido pela carência de nutrientes essenciais como N, P, Mg, K, S ou mesmo O (LEE, 1996b). Já o segundo (II), acumula quantidades expressivas de PHA ainda em fase de crescimento celular (LEE, 1996b; CROCHEMORE, 2012). Em ambos os grupos, excesso de carbono é necessário (LEE, 1996b)

com isso, o desenvolvimento e a estratégia de crescimento é dependente do tipo de microrganismo que é estudado. Normalmente, bactérias que pertencem ao primeiro grupo apresentam melhores condições em sistema de fermentação em batelada dividido em duas etapas, enquanto microrganismos do segundo grupo demonstram melhores resultados quando são produzidos em sistema de alimentação contínua (VANDAMME; COENYE, 2004). Na Tab. 6, pode-se observar a produção de PHA por diferentes microrganismos.

Tabela 6. Produção de PHA por diferentes microrganismos.

Microrganismo	PHA	Grupo	PHA (%)	Referência
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	P(3HB)		1,1-5,0	LIEBERGESELL et al., 1994
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PHA	I	20-30	EGGINK et. al., 1995
<i>Cupriavidus necator</i>	P(3HB-co-3HV)		74	LEE et al., 1996b
<i>Chromobacterium violaceum</i>	P(3HV)	I	62	
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	P(3HV)		0,02	YAMANE et. al., 1996
<i>Pseudomonas putida</i> BM01	P(3HV)		55	SONG; YOON, 1996
	PHA		37	
	PHA		25	
	PHA		28	
	PHA		19	
<i>Pseudomonas putida</i> GPp104	P(3HB)	I	14-22	TAN et al., 1997
<i>Pseudomonas sp.</i>	P(3HB)		29	CROCHEMORE et al., 2012
<i>Ralstonia solanacearum</i>	P(3HB)		45	RODRIGUES et al., 2014
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	P(3HB)	I	43	DALCANTON et al., 2010

Fonte: Adaptado de REDDY, 2006.

Entre a grande variedade de PHA conhecidas, o P(3HB) é amplamente distribuído. Este, juntamente com o Poli(3-hidroxibutirato-co-3hidroxivalerato) [(PHB-HV)] e o Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) [(PHB-HHx)] são

os mais produzidos industrialmente e explorados em escala comercial (CHEN, 2003).

1.6.1- Gênero *Bacillus*

Dentre os microrganismos produtores de PHA, destacam-se os *Bacillus*. São encontrados normalmente no ambiente, porém, diante da grande variedade existente, são pouco explorados. O gênero *Bacillus* apresenta características desejáveis para a produção de PHA, como o curto tempo de geração, crescimento fácil que possibilita alcançar uma alta densidade celular, utilização de fontes de carbono e nitrogênio de baixo custo, como tolerância a alta temperatura e alta pressão osmótica. Com condições adequadas, apresentam rápido crescimento e são capazes de se desenvolver em diversas fontes de carbono de baixo custo (WU et al., 2001). Além de serem capazes de secretar grande quantidade de enzimas e serem considerados bons “hospedeiros” para a expressão de genes heterólogos (LAW et al., 2003).

As bactérias pertencentes ao gênero são bastante empregadas na produção industrial, sobretudo na obtenção de enzimas e proteínas, podendo citar a produção industrial de vitamina B₁₂, penicilina amidase, enzima utilizada na produção de antibióticos sintéticos, entre outras (VARY, 1994). Todavia, não são muito utilizadas na produção de PHAs, principalmente por consumir a reserva de biopolímero para fins de esporulação, levando a um baixo percentual de acúmulo (WU et al., 2001), mas, apesar disso, muitos estudos estão sendo realizados na tentativa de aumentar o acúmulo de PHA por esta bactéria, testando fontes de carbono alternativas e de baixo custo (FACCIN, 2013).

O gênero *Bacillus* têm a característica de formar esporos, tanto mesófilos quanto termófilos. Em condições favoráveis para o crescimento, os esporos podem germinar resultando a formação de uma nova célula vegetativa. A formação do endósporo, formado a partir da célula-mãe, está associada as condições desfavoráveis para o crescimento vegetativo, sendo a limitação de nutrientes o estímulo mais comum na natureza (FLICKINGER; DREW, 1999; GOULD; RICHARD, 1999; ALBERTS, 2008). O processo de esporulação envolve em torno de sete estágios morfológicos, culminando na lise da célula-mãe, com liberação do esporo maduro em aproximadamente 7 a 8h após o início do processo de esporulação (VARY, 1994; FLICKINGER; DREW, 1999).

Segundo WU et al. (2001), os fatores que normalmente aumentam a produção do polímero em outras bactérias, como a limitação de nutrientes (nitrogênio e fósforo, por exemplo) ou baixa oferta de oxigênio, no caso da *Bacillus* sp. JMa5, induzem à esporulação. Esse microrganismo, quando cultivado em melão acumulou 35% de P(3HB) sobre o peso seco (WU et al., 2001).

Borah e colaboradores (2002) estudaram a influência das condições nutricionais e do ambiente para o acúmulo de P(3HB) em *Bacillus mycoides*, o que indicou que a sacarose, extrato de carne e sulfato de amônio, são elementos importantes para o crescimento e o acúmulo de polímero, obtendo rendimento de 69,4% do polímero sobre o peso seco da biomassa. Já o *B. cereus* acumulou 40,3% de polímero, 75% de 3HB e 25% de 4HB, quando crescido em meio frutose como fonte de carbono.

A síntese de PHB por *Bacillus cereus* linhagem T inicia-se após o término da fase logarítmica, atingindo seu acúmulo máximo até a formação do esporo, ocorrendo a sua degradação durante o processo de esporulação (VALAPPIL et al., 2007). Porém, em *Bacillus megaterium*, durante a fase estacionária, os grânulos de polímero formado na fase logarítmica decaem em tamanho e número por célula (MCCOOL et al., 1996). Na Tab. 7 são apresentadas algumas espécies de *Bacillus* que foram estudados em função de sua capacidade de acumular PHA.

Tabela 7. Acúmulo de PHA por alguns *Bacillus*.

Microrganismo	Fonte de carbono	Unidade Monomérica	PHA (%)	Referência
<i>B. circulans</i> DSM 1529 (1)	Acetato	3HB	43,7	VALAPPIL et al., 2007a (1)
	Ácido propiônico	3HB; 3HV	6,8	
<i>B. sphaericus</i> (1)	Sacarose	3HB	30,2	
<i>B. brevis</i> (1)	Sacarose	3HB	32,1	
<i>B. licheniformis</i> DSM394 (1)	Acetato	3HB	25,8	
	Ácido propiônico	3HB; 3HV	6,2	
<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM7 (1)	Acetato	3HB	17,0	
	Ácido propiônico	3HB; 3HV	5,1	
<i>B. laterosporus</i> DSM335 (1)	Acetato	3HB	29,5	
	Ácido propiônico	3HB; 3HV	5,0	
<i>B. macerans</i> DSM7068 (1)	Acetato	3HB	40,5	
	Ácido propiônico	3HB; 3HV	4,7	
<i>B. subtilis</i> DSM10 (1)	Acetato	3HB	33,5	
	Ácido valérico	3HB; 3HV	6,6	
<i>B. thuringiensis</i> DSM 2046 (1)	Acetato	3HB	47,6	
	Ácido propiônico	3HB; 3HV	7,2	
<i>B. mycoides</i> DSM2048 (10)	Acetato	3HB	44,7	
	Ácido propiônico	3HB; 3HV	7,5	

Microrganismo	Fonte de carbono	Unidade Monoméricas	PHA (%)	Referência
<i>B. mycooides</i> RIJB107 (1)	Sacarose	3HB	69,4	
<i>Bacillus sp.</i> JMa5	Melaço	3HB	35	
<i>B. mycooides</i> l (2)	Sacarose Extrato de carne Sulfato de amônio	3HB	69,4	WU et al., 2001 (2)
<i>B. cereus</i> (3)	Frutose		75	BORAH et al., 2002 (3)

1.6.2- Produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium*

Slepecky e Law (1961) reportaram que a produção de P(3HB) por *B. megaterium* não é obrigatória para a formação de esporo, porém, se este polímero estiver presente, poderá ser consumido durante o processo de esporulação do microrganismo. Em condições que não sejam favoráveis para a utilização rápida do polímero, as células lentamente utilizarão o polímero presente como reserva de energia e fonte de carbono e não serão propensas a esporular. Todavia, se as condições para a utilização rápida forem favoráveis, os organismos rapidamente utilizarão dessa fonte de nutrientes endógena, fazendo uso da energia que é requerida para o processo de esporulação. Nesse estudo, os autores não encontraram P(3HB) nos esporos.

Informações genéticas da bactéria têm sido utilizadas para o desenvolvimento de uma linhagem capaz de auto romper-se, em resposta à exaustão de substrato, durante a produção de P(3HB) (HORI et. al., 2002). Além disso, genes de *B. megaterium* relacionados à produção de P(3HB), estão sendo inseridos com sucesso em *Bacillus subtilis* (LAW et al., 2003).

Um dos fatores limitantes para a comercialização dos PHAs em geral é o custo do substrato para a sua produção, por este motivo, busca-se a utilização de substratos de baixo custo, como é o caso do uso de melaço de cana de açúcar para a produção de P(3HB) por *B. megaterium*, com um rendimento de 46,2% de P(3HB) sobre o peso seco da biomassa (GOUDA et al., 2001).

Em 2001, Omar e colaboradores cultivaram *B. megaterium* utilizando como fonte de carbono xarope de tâmaras e melaço de beterraba e obtiveram

um acúmulo de 52% e 50%, respectivamente. Ao testar a fonte de nitrogênio com a adição de milhocina, (subproduto do beneficiamento do milho) (SILVA et al., 2010) como fonte de carbono, verificaram que o cloreto de amônio possibilitou um maior acúmulo, comparado a outras fontes de nitrogênio testadas. Ao realizar experimentos em biorreator com volume de 30 litros, a produção de polímero mostrou ser associada ao crescimento, onde os autores verificaram que, possivelmente, a limitação de nitrogênio provocou esporulação com consequente consumo de P(3HB), levando a um menor acúmulo, comparado ao obtido em frasco agitado.

Naranjo et al. (2013), ao estudarem a valorização do glicerol na produção de biopolímeros utilizando *B. megaterium*, verificaram que comparando a fonte estudada e a glicose em condições controladas de pH 7, saturação de oxigênio de 80% e temperatura de 33°C, acumulou 62,4% de polímero, 59,1% do polímero sobre o peso seco da biomassa utilizando a glicose como fonte de carbono.

Vijayendra et al. (2007) trabalharam com *B. megaterium* usando milhocina como fonte de nitrogênio. Ao realizarem a otimização do meio de cultura, analisaram a concentração de inóculo, sacarose, milhocina e sais de fosfato, onde observaram que um inóculo com uma concentração maior de nutrientes, favorece a formação de biomassa, enquanto que um inóculo com as concentrações menores, desfavorece a formação de biomassa, mas favorece a formação de polímero. Verificaram também, que uma maior concentração de sais de fosfato diminui o acúmulo de polímero, e a limitação de fosfato juntamente com a limitação de nitrogênio, aumentaria a produção do polímero, sendo o maior acúmulo de P(3HB), foi de 51,2% obtido após 72 horas de cultivo.

Em experimentos em incubadora orbital variando a razão carbono: nitrogênio, com o objetivo de aumentar a produção do polímero sem que a fonte de carbono seja desperdiçada, Faccin (2013) observou que a melhor condição obtida foi para uma razão carbono: nitrogênio igual a 8, com acúmulo de polímero de 70% de biomassa seca. Foi observado que no experimento com limitação de nitrogênio ocorreu o consumo do polímero.

Ao trabalharem com cultivo de *B. megaterium* em melaço de cana como fonte de carbono e ureia como fonte de nitrogênio, Kulpreecha et al., (2009)

utilizando um biorreator em batelada com 12 horas de cultivo, observaram que o acúmulo de polímero alcançado foi de 61,6%, porém, em condições de batelada alimentada com estratégia de pH-*stat* iniciando a alimentação em 8 horas de cultivo, diminuiu para 42,1%.

Reddy et al. (2009), avaliaram em frasco agitado em estufa orbital, utilizando o glicerol ou glicose como fonte de carbono, a produção de PHA pela bactéria *B. megaterium* isolada a partir de amostra de esgoto municipal e verificaram um acúmulo de polímero, respectivamente de 62,3 e 58,6% de PHA em relação à biomassa total. É importante ressaltar que utilizando a glicose como fonte de carbono, foi obtido copolímero P(3HB-co-VB) sem adição do precursor ácido propiônico, normalmente empregado para a produção deste copolímero.

López et al. (2012), reportaram acúmulo de P(3HB) próximo de 60% na bactéria *B. megaterium* em um cultivo com baixa disponibilidade de oxigênio (percentual de oxigênio dissolvido controlado em 20%), utilizando tanto glicerol quanto glicose como fonte de carbono. Também foi constatado que uma razão alta de carbono:nitrogênio resultou em um menor acúmulo de P(3HB). A Tab. 8, mostra o gênero *Bacillus* que foram utilizados para a verificação de rendimento de P(3HB) através de diferentes fontes de nutrientes.

Tabela 8. Rendimento de P(3HB) por diferentes fontes de nutrientes e gênero de *Bacillus*.

Referência	Microrganismos	Fonte de nutrientes	Teor de P(3HB) (%)
MIRTHA et al., 1995	<i>B. megaterium</i> QMB1551	Glicose	20
GOUDA et al., 2001	<i>B. megaterium</i>	Melaço de cana-de-açúcar	46,2
OMAR et al., 2001	<i>B. megaterium</i>	Xarope de tâmaras	52
		Melaço de beterraba	50
VIJAYENDRA et al., 2007	<i>B. megaterium</i>	Milhocina	51,2
KULPREECHA et al., 2009	<i>B. megaterium</i>	Melaço de cana e ureia	61,6
		Glicerol	62,3
REDDY et al., 2009	<i>B. megaterium</i>	Glicose	58,6
		Glicerol	60
LÓPEZ et al., 2012	<i>B. megaterium</i>	Glicerol	60
		Glicose	
FACCIN, 2013	<i>B. megaterium</i>	Carbono: Nitrogênio	70
NARANJO et al., 2013	<i>B. megaterium</i>	Glicerol	62,4
		Glicose	59,1

1.7- Meio de cultivo

Os meios de cultivo contendo sais minerais (meios minerais) são os mais utilizados quando se tem por finalidade o acúmulo de P(3HB) no citoplasma bacteriano. São compostos principalmente de sais como ácido cítrico (0,1 a 1,7g/L), cloretos de cálcio (0,01 a 0,02g/L) e sódio (0,8g/L), fosfatos de potássio (1,5 a 5,5g/L) e sódio (0,6 a 9,0g/L), sulfatos de amônio (1,0 a 5,0g/L) e magnésio (0,2 a 1,2), associados a uma solução de oligoelementos ou elementos traço. A solução de elementos traços pode

conter ácido bórico, cloreto de manganês, bem como, sulfatos de cobre, ferro, níquel e zinco (MARTÍNEZ et al., 2004; BARBOSA et al., 2005; GRIGULL et al., 2008; RAMADAS, et al., 2009; FACCIN et al., 2013; NARANJO et al., 2013; RODRÍGUEZ-CONTRERAS et al., 2014). Além desses nutrientes, deve ser fornecida ao microrganismo uma fonte de carbono e de nitrogênio, as quais podem variar grandemente.

O tipo de fermentação em batelada alimentada é considerado como o método mais eficaz para se conseguir elevada densidade de cultivo celular (SUN et al., 2006). Com a técnica de alimentação de substrato adequado, as concentrações dos nutrientes principais (geralmente a fonte de carbono) podem ser mantidas a um nível ótimo de modo que occasiona elevado rendimento e produtividade (YAMANE; SHIMIZU, 1984; SUN et al., 2007).

A fonte de carbono varia em relação às necessidades do microrganismo e a capacidade de absorção, podendo ser açúcar simples do tipo monossacarídeo, como a glicose ou frutose (BARBOSA et al., 2005) assimiláveis pelas vias EDP e EMP respectivamente, ou dissacarídeos, como a sacarose (FACCIN et al., 2013), cuja assimilação depende da produção de sacarose pelo microrganismo ou a hidrólise prévia desses açúcares complexos, como amido e pectinas, como uma boa fonte de açúcares. Entretanto, muitas bactérias não produzem hidrolases necessárias à decomposição havendo a necessidade de hidrólise prévia a etapa de hidrólise para a liberação de açúcares simples facilmente metabolizáveis, através de acidificação ou por métodos enzimáticos (VAN-THUOC et al., 2007). Determinados microrganismos, por não produzirem amilases, não possuem capacidade de utilizar o amido como fonte de carbono. Por isso, antes do processo biotecnológico, o amido deve ser hidrolisado a glicose (KIM, 2000). Barbosa e colaboradores (2005) utilizaram a frutose (5, 10 e 15g/L) como fonte de carbono para obter um melhor desenvolvimento e crescimento da cepa nativa de *Ralstonia eutropha*. Para isso, utilizaram diferentes concentrações de frutose em processo conduzido como batelada alimentada, em biorreator. Quando o microrganismo consumia o açúcar disponível, adicionavam açúcar equivalente à concentração inicial do meio de cultivo. Em todas as concentrações analisadas foram obtidas biomassas secas de 7,5 g/L, já para acúmulo de P(3HB) os melhores resultados foram para as

concentrações 5 e 15 g/L, 66 e 57%, respectivamente, e em 10 g/L foi alcançado acúmulo de 44%.

A fonte de carbono pode ser responsável por 25-45% dos custos totais de produção (NATH et al., 2008), portanto, há necessidade de encontrar fontes de carbono de menor custo para diminuir o valor agregado da produção de PHA. A abundância de biomassa disponível em todo o mundo e oriunda de carbono renovável pode ser usada como a matéria-prima para a produção. Muitos resíduos e subprodutos de indústrias agrícolas e laticíneos são candidatos atrativos, uma vez que eles têm algumas das principais características pretendidas como baixo custo e alta disponibilidade (KIM, 2000).

Uma grande variedade de substratos, tais como melaço de cana (SILVA et al., 2004; BENGTSSON et al., 2010), glicerol (CAVALHEIRO et al., 2009; RODRÍGUEZ-CONTRERAS et al., 2014; NARANJO et al., 2013), soro de leite (NATH et al., 2008), amido de arroz (DALCANTON et al., 2010) e óleos vegetais (LEE et al., 2008) têm sido utilizados com diferentes microrganismos para a produção de PHAs.

Entre os subprodutos agrícolas mencionados, o melaço de cana tem sido amplamente utilizado em vários processos de fermentação comerciais por conter vitaminas e nutrientes que ajudam a promover o crescimento e metabolismo microbiano (BENGTSSON et al., 2010). Kanjanachumpole et al. (2013) avaliaram a influência de diferentes concentrações de melaço de cana (46°Brix, 20, 40, 60 e 80g/L) de açúcares totais como fonte de carbono para *Bacillus megaterium* BA-019, em biorreator de 10L. Com a concentração de melaço de 60g/L, foram obtidos os melhores resultados tanto de massa celular seca quanto de acúmulo de P(3HB), 32,5 e 8,8 g/L, respectivamente, em apenas 12h de produção. Kulpreecha e colaboradores (2009) compararam o melaço de cana (20g/L) e sacarose na mesma concentração como fonte de carbono. A biomassa seca e o rendimento de P(3HB) foram significativamente melhorados quando utilizaram melaço, em vez de sacarose, foi usado como fonte de carbono, independentemente da fonte de nitrogênio. Esse resultado é de extrema relevância, uma vez que representa fonte de carbono de menor custo e fácil assimilação.

O efeito observado com o uso do melaço de cana pode ser causado pela presença de outros nutrientes em sua composição. Além de glicose, frutose e sacarose, os ácidos orgânicos, minerais e vitaminas, tais como: tiamina, riboflavina e piridoxina, as quais funcionam como fatores de crescimento, podem resultar em elevado crescimento de células e de produção de P(3HB) (KULPREECHA et al., 2009).

O glicerol, importante subproduto agrícola, é o principal resíduo da produção de biodiesel, representando aproximadamente 35% da produção. Apesar do glicerol puro ser uma importante matéria-prima industrial, com aplicações em alimentos, medicamentos, cosméticos e indústrias de tabaco, o glicerol bruto tem um valor relativo baixo devido à presença de impurezas. Para esse subproduto ser realmente reaproveitado devem ser realizadas diversas etapas de purificação para a remoção destas impurezas, sendo essas fases dispendiosas e, muitas vezes, fora do alcance da viabilidade econômica para plantas de pequeno e médio porte (YAZDANIE; GONZALEZ, 2007). Conversões biológicas oferecem oportunidade para sua utilização na síntese de grande variedade de produtos com diversas funcionalidades. O glicerol pode ser usado como fonte de carbono substituindo açúcares em vários processos microbiológicos. A produção de PHA é uma alternativa interessante para a transformação biológica de glicerol.

Cavalheiro e colaboradores (2009) exploraram duas estratégias para melhorar a produção de PHAs: utilização de culturas de alta densidade e a utilização de resíduos de glicerol (GRP), como fonte primária de carbono para o crescimento de *Cupriavidus necator* DSM 545 e a síntese de polímeros. Nesse trabalho, os autores avaliaram a produção de P(3HB) a partir de glicerol comercial (PG), substrato controle, e GRP. Utilizando PG, o acúmulo de P(3HB) foi de 62%, com produtividade de massa celular seca de 82,5 g/L, com a utilização de GRP alcançaram acúmulo de 50% de P(3HB) e massa celular seca de 68,8g/L. Naranjo e colaboradores (2013) compararam a utilização de glicose e glicerol como fonte de carbono e alcançaram maior acúmulo de P(3HB) em *Bacillus megaterium* com glicerol, 62%; utilizando glicose, o acúmulo foi de 59% para as mesmas condições de cultivo. Já Rodríguez-Contreras e colaboradores (2014) associaram as duas fontes de carbono, alternando a alimentação no biorreator com glicose e glicerol,

conseguindo bons resultados, 65% e 68% de acúmulo de P(3HB) e biomassa, respectivamente, para *Cupriavidus necator* DSM 545.

O amido e seus derivados, fontes de carbonos disponíveis em grande quantidade no Brasil, são os principais componentes da demanda bioquímica de oxigênio de efluentes de indústrias têxteis, fermentativas e de processamento de alimentos e bebidas (YU, 2001). Nas indústrias de alimentos, o amido pode ser obtido de grãos como arroz, trigo e milho, e tubérculos como batata e mandioca (SARIKAVA et al., 2000). Rusendi e Sheppard (1995) utilizaram resíduo da indústria processadora de batatas para a produção de P(3HB) e, através de uma hidrólise enzimática, obtiveram glicose como fonte de carbono. Dalcanton e colaboradores (2010) utilizaram como meio de cultivo amido de arroz hidrolisado adicionado dos nutrientes que compõem o meio mineral. Além disso, realizaram a suplementação do meio com óleo de soja. Concluíram que a utilização de amido hidrolisado de arroz mostrou-se ser uma alternativa potencial para a produção de P(3HB). Ainda vale destacar que o arroz hidrolisado também apresenta concentrações satisfatórias da fonte de carbono metabolizável, além de possuir em sua composição cerca de 10 a 15% de proteínas que, hidrolisadas, servem como fonte de nitrogênio e fósforo para o microrganismo e, ainda, uma pequena porcentagem de lipídeos, fibras e minerais (aproximadamente 1%). A suplementação com óleo de soja, mesmo em pequenas quantidades, levou a um aumento na produção de P(3HB) (43%), comparado ao meio sem suplementação (35%).

Ramadas e colaboradores (2009) avaliaram diferentes fontes de carbono (farelo de trigo, amido de batata, torta de óleo de gergelim, torta de óleo de amendoim, mandioca em pó, pó de semente de jaca e farinha de milho) em cultivo de *Bacillus sphaericus* 5149. O meio de cultivo contendo o farelo de trigo como substrato mostrou-se mais eficiente beneficiando o crescimento celular, resultando em 15,5g/L de biomassa; porém, para o acúmulo de P(3HB), o uso do pó de semente de jaca e amido de batata resultaram em maior rendimento, 46 e 47%, respectivamente.

Estudos de suplementação de cultivos utilizando os ácidos oleico e linoleico demonstraram que as adições destes levam a um aumento na produção de PHAs (SQUIO; ARAGÃO, 2004). Esses ácidos graxos fazem

parte da composição de muitos óleos vegetais tornando-os uma possível alternativa de baixo custo para suplementação de cultivos. Grigull e colaboradores (2008) avaliaram diferentes concentrações de ácido oleico (0 a 3,0g/L) em meio de cultivo mineral, associando glicose e frutose como fontes de carbono, para a linhagem de *Ralstonia eutropha* DSM 545. Concluíram que o ácido oleico foi consumido na fase exponencial de crescimento e o aumento da concentração desse suplemento alimentar ocasionou o aumento na taxa de crescimento bacteriano. Os autores obtiveram rendimento de 6,96g/L de biomassa com a suplementação de 3,0g/L de ácido oleico, e nessa mesma concentração foi obtido o maior acúmulo de P(3HB) (16,7%).

A ureia é a melhor fonte de nitrogênio devido à capacidade de *B. megaterium* BA-019 assimilar melhor do que os outros compostos nitrogenados. A ureia é uma pequena molécula polar não carregada e, em contraste com o sulfato de amônio, a taxa de absorção de ureia através da membrana celular é menos dependente do pH e mais rápida. Certamente, a utilização de uma fonte de nitrogênio barata como essa pode reduzir o custo de produção de P(3HB), se a estirpe bacteriana utilizada puder utilizá-lo de forma eficiente (BORMANN et al., 1998). Kulpreecha et al. (2009) também avaliaram a ureia e o sulfato de amônia e (0,8 g/L) como fontes de nitrogênio para *Bacillus megaterium* BA-019. No que diz respeito à fonte de nitrogênio, foram obtidos maiores rendimentos de biomassa (7,05g/L) e de P(3HB) (55,46 %) com a utilização de ureia.

Os resultados obtidos pelos trabalhos mencionados, referentes à fonte de carbono e nitrogênio, nesta revisão, podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 9. Rendimentos de massa celular seca e acúmulo de P(3HB) obtidos em cultivos de diferentes microrganismos, fontes de carbono e nitrogênio.

Microrganismo	Fonte de C/N	MCS (g/L)	P(3HB) (%)	Referência
<i>Bacillus megaterium</i>	Glicose	7,1	59,1	NARANJO et al., 2013
	Glicerol	7,7	62,4	
<i>Bacillus megaterium</i> BA-019	Melaço de cana 20g/L	10,9	2,9	KANJANACHUMPOL et al., 2013
	40g/L	23,1	7,4	
	60g/L	32,5	8,8	
	80g/L	29,5	7,8	
<i>Bacillus megaterium</i> BA-019	Sacarose/Sulfato de amônia	1,96	28,57	KULPREECHA et al., 2009
	Sacarose/Ureia	2,83	30,2	
	Melaço/Sulfato de amônia	6,25	49,92	
	Melaço/Ureia	7,05	55,46	
<i>Bacillus sphaericus</i> 5149	Farinha de milho	1,5	3,3	RAMADAS et al., 2009
	Farelo de trigo	15,5	6,8	
	Mandioca em pó	2,5	6,4	
<i>Cupriavidus necator</i>	Glicerol Comercial	82,5	62	CAVALHEIRO et al., 2009
	Resíduo de Glicerol	68,8	50	
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Amido de milho com óleo de soja	11,64	43	DALCANTON et al., 2010
	Amido de milho sem óleo de soja	12,4	35	
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Glicose + Glicerol	68,5	64,5	RODRÍGUEZ-CONTRERAS et al., 2014
<i>Burkholderia sacchari</i> DSM 17165		43,8	10,2	
<i>Ralstonia eutropha</i> DSM 545	Glicose + Frutose Ácido oléico 0g/L	1,02	16,7	GRIGULL et al., 2008
	Ácido oléico 0,3g/L	1,02	16,7	
	Ácido oléico 0,9g/L	2,10	16,7	
	Ácido oléico 1,5g/L	2,64	16,7	
<i>Ralstonia eutropha</i> DSM 545	Ácido oléico 3,0g/L	6,96	16,7	GRIGULL et al., 2008
<i>Ralstonia eutropha</i> ATCC 17697	Frutose 5g/L	7,5	66,2	BARBOSA et al., 2005
	Frutose 10g/L	7,5	44,5	
	Frutose 15g/L	7,5	57,3	

Mais de 160 tipos de composições monômeros de PHAs já foram descritos (FORMOLO et al., 2003), e um crescimento exponencial para a

descoberta de novos constituintes, proporcionada pelo uso de diferentes substratos precursores, novas bactérias e o emprego de técnicas de engenharia genética e metabólica (LUENGO et al., 2003). O copolímero P(3HB-co-3HV) é um exemplo de polímero que é sintetizado quando introduzido precursores no meio de cultivo, como ácido propiônico e valérico. As unidades de 3-hidroxicaproato (HV) torna o polímero mais flexível, que facilita as condições de processamento e são mais interessantes para diversas aplicações e elaborações de produtos (BYROM, 1987; LEE, 1996; BUCCI, 2003; SERAFIM et al., 2003; QUILLAGUAMÁN et al., 2010).

Ao utilizar precursores não convencionais para produzir PHAs pode apresentar propriedades desejáveis como piezeletricidade reforçada, atividade óptica não-linear, biodegradabilidade e biocompatibilidade proporcionando ao PHA potencial para concorrer com polímeros funcionais (CHEN, 2008). Eles podem ser provenientes de fontes naturais renováveis como milho, celulose, batata, cana de açúcar, ou serem sintetizados por bactérias a partir de pequenas moléculas como o ácido butírico ou o ácido valérico ou até mesmo serem derivados de fonte animal, como a quitina, a quitosana ou proteínas (BRITO et al., 2011).

Pinzón (2015) ao estudar sobre a caracterização do gene PHA sintase de bactérias isoladas a partir de amostras de solo, verificou que nos experimentos que forneceu glicose a uma concentração de 10g/L e ácido butírico e octanóico (1g/L) detectou somente P(3HB), não gerando unidades do copolímero 3HHx em linhagens recombinantes de *Burkholderia sacchari* LFM344, abrigando os genes *phaC* dos isolados.

1.8- Condições de cultivo – Tempo, temperatura, pH e oxigênio

Em geral, a otimização das condições de fermentação tem provado ser bem sucedida em melhorar substancialmente o rendimento do produto e a produtividade de muitos processos biológicos (CHOI et al., 1996). Dado que a síntese de P(3HB) é conhecida por ser favorecida por estresses ambientais, tais como limitação de nutrientes essenciais como nitrogênio, fosfato ou oxigênio (BRAUNEGG et al., 1998) tal estratégia vem sendo amplamente utilizada. Além disso, outros fatores corroboram para um processo mais

eficiente de conversão de substrato em produto, como tempo, temperatura e pH ideais.

Kulpreecha e colaboradores (2009) avaliaram o efeito do pH (6,0; 7,0 e 8,0) e da concentração de oxigênio dissolvido (OD) (40, 60 e 80% de saturação) no meio de cultivo para fermentação em batelada de *Bacillus megaterium* BA-019. Para o rendimento de biomassa o melhor resultado (9,7g/L) foi obtido na fermentação sem controle de pH e com nível de OD saturado de 60%, porém não diferiu estatisticamente do resultado obtido com pH 8,0 e saturação de 80% (9,5g/L). Considerando o rendimento de P(3HB) acumulado na célula, a combinação de pH 7,0 e saturação de 60% permitiu acúmulo de 61,6% em relação a massa celular seca. Isto pode ser devido ao fato do pH 7,0 ser o valor ótimo das enzimas chaves na via biossintética de P(3HB), para esse microrganismo, portanto, no pH mais elevado ou mais baixo do que o ideal, a atividade enzimática diminui. Relata-se que as mudanças de pH reduzem o desempenho da cultura e o valor inicial do pH pode afetar a disponibilidade de elementos traço necessários para a bactéria no meio de cultura (GROTHER et al., 1999).

Em relação ao OD, no nível 40% de saturação a produtividade diminuiu dramaticamente, pela quantidade insuficiente de oxigênio disponível no meio de cultura para satisfazer exigências anabólicas aeróbias. No entanto, os níveis de OD mais elevados (80%) reduziram significativamente o crescimento bacteriano, provavelmente devido ao estresse oxidativo e de cisalhamento que resultaram das velocidades altas de agitação (KULPREECHA et al., 2009). Por esse motivo, seria interessante manter uma velocidade de agitação constante e ajustar os níveis de oxigênio por meio da adição de ar enriquecido de oxigênio puro para prevenir o estresse causado na célula bacteriana.

Ramadas e colaboradores (2009), além de testar diferentes resíduos agroindustriais como fonte de carbono, testaram diferentes valores de pH (5,0 a 8,0) para o cultivo da linhagem *Bacillus sphaericus* 5149. A alteração inicial do pH no meio de cultivo mostrou uma forte influência sobre a produção de P(3HB). Mesmo uma pequena diferença de pH do ponto ideal causou uma redução brusca no acúmulo. Nesse trabalho, o meio com pH inicial de 7,5 resultou no aumento máximo de P(3HB) de 25%. A alteração drástica na

produção parece ser devido ao efeito do pH inicial na biodisponibilidade de oligoelementos.

A principal diferença entre os processos fermentativos em *shaker* e em biorreator é o fornecimento de oxigênio e a velocidade de agitação, em *shaker* não é possível o controle do fornecimento ou da taxa de oxigênio dissolvido e as velocidades de agitação são menores (OD). A maioria dos processos microbianos industriais é aeróbio e são realizados, principalmente, em meio contendo sais e substâncias orgânicas. Nesses processos, o oxigênio é um nutriente importante que é usado pelos microrganismos para o crescimento, manutenção e produção de metabólitos, e a escassez deste afeta o desempenho do processo (GARCIA-OCHOA et al., 2000; CALIK et al., 2004; GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009). Portanto, é importante assegurar um fornecimento adequado de oxigênio a partir de uma corrente de gás para o meio de cultura. Consequentemente, a taxa de transferência de oxigênio (OTR) varia conforme as condições operacionais e tem um papel relevante para a predição da via metabólica para o crescimento e a produção de qualquer metabólito no cultivo. Assim, quando é necessário o fornecimento de baixo nível de OD para que o mesmo seja limitado e induza ao estresse, como exemplo para *Bacillus megaterium*, o qual é aeróbio estrito, a fermentação em biorreator se torna necessária para atingir altos níveis de produção P(3HB) por meio do controle do OD em baixos níveis (FULL et al., 2006).

Faccin e colaboradores (2013) avaliaram a transferência de oxigênio submetendo o cultivo de *Bacillus megaterium* DSM 32 a diferentes agitações (100, 200, 300, 400, 500 e 600rpm). O maior rendimento de P(3HB), 62%, foi obtido pela agitação de 200rpm gerando um coeficiente de transferência de oxigênio (k_La) de 0.006 s^{-1} . O (k_La) é um parâmetro importante, uma vez que está relacionado à taxa de transferência de oxigênio (OTR) e é comumente aplicado quando deseja-se aumento de escala de produção (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009).

Martínez et al. (2004) avaliaram o efeito do pH (6,0; 6,8 e 7,4), da agitação (300 e 700rpm) e da aeração (0,25 e 1vvm) para o microrganismo *Azospirillum brasilense* cepa 7 utilizando extrato de tomate como fonte de carbono. Obtiveram o rendimento máximo de biomassa de 1,67g/L e P(3HB) de 0,16g/L, em pH de 6,8. Agitação de 500rpm e aeração de 0,5vvm se

mostrou a melhor combinação para biomassa (1,2g/L), porém para obter maior rendimento de P(3HB) (4,9g/L) o cultivo foi mantido em maior agitação (700rpm) e menor aeração (0,25vvm).

Dalcanton e colaboradores (2010) avaliaram o efeito de diferentes temperaturas (30, 35 e 40°C) para o cultivo de *Cupriavidus necator* DSM 545. O cultivo realizado à temperatura de crescimento de 35°C apresentou vantagens no crescimento (12,4g/L) e produção de P(3HB) (43%) quando comparado ao realizado à temperatura de 30°C, atualmente utilizada nos processos de produção deste polímero, e 40°C. Sabe-se que as enzimas presentes nesse microrganismo, assim como em outros, apresentam atividade máxima quando fatores, como a temperatura, se aproximam do seu ótimo, podendo haver o aumento da velocidade específica de crescimento e, conseqüentemente, mudanças favoráveis no fator de conversão de substrato em produto. Esse aumento da temperatura do cultivo pode ainda ter influência significativa na produtividade do processo, devido à diminuição do tempo de cultivo. Porém, de acordo com Schimdell (2001), temperaturas de cultivo muito elevadas diminuem a concentração de oxigênio dissolvido no meio, fator este importante na produção de P(3HB) quando se trata de um processo aeróbio. Nesse contexto, o estudo da influência da temperatura de cultivo sobre a produção de P(3HB) mostra-se de extrema importância, uma vez que o aumento da temperatura implicaria ainda em uma menor necessidade de resfriamento durante o processo.

Ao destacar que o acúmulo das inclusões lipofílicas é dependente de tempo de cultivo para *Pseudomonas* Cepa CMM43, Crochemore e colaboradores (2012) realizou o cultivo em frascos incubados em *shaker*, na temperatura de 28°C, rotação de 150rpm, nos tempos de 24, 48 e 72h. O maior acúmulo de P(3HB) foi verificado no tempo de 48h (29%), com rendimento de massa celular de 5,8g/L. O menor acúmulo foi verificado em 24h de cultivo, fato já esperado devido ao curto espaço de tempo, uma vez que o processo de produção e acúmulo de P(3HB) é, normalmente, um processo lento (Jiang et al., 2008). Em 72h de cultivo, o acúmulo de polímero reduziu cerca de 4% em relação ao tempo de 48h, foi verificado ainda que o consumo de açúcar manteve-se após 48h de cultivo, mostrando que a

bactéria utilizou o polímero como fonte de carbono (CROCHEMORE et al., 2012).

Resultados obtidos nesses trabalhos e em outros não mencionados, referentes às condições operacionais, podem ser observados na Tabela 10.

Tabela 10. Rendimentos de massa celular seca (MCS) e acúmulo de P(3HB) obtidos em cultivos de diferentes microrganismos em diferentes condições, em shaker e biorreator.

Microrganismo	Equipamento	pH	T (°C)	Rotação (rpm)	Tempo (h)	Aeração (vvm)	MCS (g/L)	P(3HB) (%)	Referências
<i>Azospirillum brasilense</i> cepa 7	Shaker	6	32	70	36	NC	1,42	7,7	Martínez et al., 2004
		6,8					1,67	9,6	
		7,4					1,62	7,4	
<i>Azospirillum brasilense</i> cepa 7	Biorreator	6,8	32	300	24	0,25	1,95	1,5	Martínez et al., 2004
				300		0,75	3,58	2,8	
				500		0,5	1,95	61,5	
				700		0,25	4,9	9,2	
				700		0,75	3,9	1	
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Shaker	7	30	150	24	NC	7,8	39	Dalcanton et al., 2010
			35				11,64	43	
			40				NC	NC	
<i>Bacillus megaterium</i> DSM 32	Biorreator	NC	7	100	30	0,8	NC	49	Faccin et al., 2013
				200				62	
				300				49	
				400				40	
				500				39	
<i>Bacillus megaterium</i> DSM 32	Fermentador	NC	7	600	30	0,8	NC	39	Faccin et al., 2013
<i>Bacillus megaterium</i> BA-019	Fermentador	Sem controle	NC	NC	12	60%	9,8	24,4	Kulpreecha et al., 2009
		6			12	60%	7,9	52,5	
		7			12	60%	8,8	61,6	
		7			12	80%	8,3	58,0	
		7			24	40%	6,4	47,0	
		8			18	60%	9,5	28,9	

Microorganismo	Equipamento	pH	T (°C)	Rotação (rpm)	Tempo (h)	Aeração (vvm)	MCS (g/L)	P(3HB) (%)	Referências
<i>Bacillus sphaericus</i> 5149	Shaker	7,5	30	200	36	NC	NC	25	Ramadas et al., 2009
<i>Pseudomonas</i> Cepa CMM43	Shaker	NC	28	150	24	NC	2,14	9	Crochemore et al., 2012
					48		5,8	29	
					72		6,3	25	

*NC: não consta;

Pode-se observar pelas tabelas anteriores que os fatores que possuem a maior importância para obter um rendimento e qualidade de polímero, excluindo-se a necessidade de um meio que aporte os constituintes básicos primeiramente deve-se considerar o microrganismo que será utilizado, logo após, o tempo e a temperatura, seguido pela aeração, agitação e pH. Além destes fatores, o método de recuperação do polímero deve ser analisado para obter um maior rendimento.

2. Hipótese e Objetivos

2.1 Hipótese

Cepa de *Bacillus megaterium* CN3, pertencente à coleção de culturas de microrganismos do Laboratório de Biopolímeros da unidade do curso de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico CDTec/UFPel, pode ter a concentração de Massa Celular Seca (MCS) e de acúmulo de P(3HB) aumentados pela suplementação do meio de cultivo padrão com lipídeos.

2.2- Objetivos

2.2.1- Objetivo geral

Aumentar a concentração celular e o acúmulo de grânulos de P(3HB) em cultivo de *Bacillus megaterium* pela suplementação do meio padrão com ácido butírico e óleo de arroz.

2.2.2- Objetivos específicos

Estabelecer concentrações ótimas de óleo de arroz e Tween 80:Lecitina de soja para a produção de P(3HB) pela linhagem de *Bacillus megaterium*.

Estabelecer concentrações ótimas de ácido butírico e pH para a produção de P(3HB) pela linhagem de *Bacillus megaterium*.

Avaliar a concentração celular através das análises de biomassa celular por densidade óptica (DO_{600}), MCS e acúmulo de polímero nos tempos de 24, 48 e 72h de produção com a adição do suplemento de óleo de arroz e Tween80:Lecitina de soja ao meio de produção

Avaliar a concentração celular através das análises de biomassa celular por densidade óptica (DO_{600}), MCS e acúmulo de polímero nos tempos de 24, 48 e 72h de produção com a adição do suplemento de ácido butírico e variação de pH ao meio de produção.

3. Capítulo 1

Crescimento celular e acúmulo de polímero de Poli(3-hidroxi-*butirato*) por *Bacillus megaterium* CN3: influência da adição de lipídeos emulsionados.

Resumo. Cada vez mais presente no nosso cotidiano, os plásticos são utilizados de múltiplas formas. A rápida descartabilidade de alguns objetos e a dificuldade de degradação dos plásticos de origem petroquímica acabam gerando um grave problema ambiental. Nesse contexto, o interesse pelo estudo de alternativas que possam minimizar o impacto ambiental causado está em constante crescimento. Uma dessas alternativas encontra-se nos biopolímeros, entre eles os polihidroxicanoatos, polímeros plásticos intracelulares dos quais o mais estudado é o Poli(3-hidroxi-*butirato*) [(P(3HB))]. No presente estudo, objetivou-se avaliar o rendimento de massa celular seca e de polímero em meio de cultura suplementado com óleo de arroz e emulsionado com os emulgentes Tween80:Lecitina de soja. Foram realizados 11 tratamentos com diferentes concentrações de óleo de arroz e Tween 80-Lecitina de soja segundo delineamento composto central rotacional tipo 2², o qual mostrou que o melhor resultado para a análise de MCS de 10,53g/L em 48h de produção encontrando-se no no ponto central do delineamento com a combinação de 5mL/L de óleo de arroz e 25g/L de lecitina de soja. No entanto, o rendimento de 18,2% de acúmulo de P(3HB) em uma MCS de 11,9g/L.

1. Introdução

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são bioplásticos tipo poliésteres acumulados no citoplasma bacteriano como material de reserva de energia e carbono. Produzidos a partir de fontes renováveis, se degradam completamente e em curto período de tempo pela ação enzimática de microrganismos, quando em condições apropriadas no meio ambiente; além disso, são termoplásticos e atóxicos (PIEMOLINI, 2004).

Dentre os PHAs, o Poli(3-hidroxi-*butirato*) ou P(3HB) é o mais estudado. Apresenta, em alguns aspectos, propriedades e características semelhantes

àquelas do polipropileno: termoplástico com temperatura de fusão semelhante, altamente cristalino, elevado grau de polimerização e insolubilidade em água (GOMES; BUENO NETTO, 1997).

Os fatores econômicos que afetam a sua produção incluem os custos de matérias-primas e o processamento (MOZUMDER et al., 2014). A redução destes depende da obtenção de linhagens altamente eficientes na conversão dos substratos em polímero, da utilização de substratos de baixo custo e do desenvolvimento de processos que permitam tornar os custos de recuperação do produto os menores possíveis (GOMES; BUENO NETTO, 1997).

Estudos de suplementação de cultivos utilizando os ácidos oléico e linoléico demonstraram que a adição destes resulta em aumento na produção de PHAs (SQUIO; ARAGÃO, 2004). Esses ácidos graxos fazem parte da composição de muitos óleos vegetais, tornando-os uma possível alternativa de baixo custo para suplementação de cultivos.

Quando óleos vegetais são adicionados ao meio de cultivo, primeiramente os triacilgliceróis devem ser convertidos em seus respectivos ácidos graxos e glicerol (DELGADO, 2006). Assim a enzima não precisa ser adicionada separadamente ao meio de cultivo. Após a conversão dos triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol, os ácidos graxos são convertidos a Acetil-CoA pela via conhecida por β -oxidação. As unidades de Acetil-CoA formadas podem ser utilizadas para três fins: o ciclo de Krebs, a biossíntese de P(3HB) e a biossíntese de ácidos graxos. Quando o meio de cultivo não se encontra limitado em um dos nutrientes essenciais, Acetil-CoA é desviado para o ciclo de Krebs, onde ocorre a produção de energia e intermediários que serão utilizados na produção de biomassa. Já em condições de limitação, o Acetil-CoA é desviado para a biossíntese de P(3HB), uma vez que o crescimento celular no meio diminui. No caso da glicose, esta é convertida a Acetil-CoA pela via glicólica que então entra na via de biossíntese de P(3HB) (SCHMIDT, 2011).

Esse trabalho teve por objetivo avaliar o rendimento de massa celular seca e de polímero de P(3HB) em meio de cultura suplementado com óleo de arroz e emulsionado com os emulgentes Tween80:Lecitina de soja.

2. Material e Métodos

Foi utilizado linhagem *Bacillus megaterium* CN3, pertencente à coleção de culturas de microrganismos do laboratório de Biopolímeros da unidade de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas.

A linhagem CN3 foi primeiramente incubada a 36 °C, durante 24 h, em meio sólido *Nutritive Yeast Agar* (AYN) (extrato de levedura: 3g/L; extrato de malte: 3g/L; glicose: 10g/L; peptona: 5g/L) (PAGGE,1982). Depois, as células foram suspensas em meio líquido YM (10mL) (JEANS, 1974). Após, porções de 200mL da suspensão bacteriana foram colocados em frascos *Erlenmeyers* de 500mL. As condições de incubação foram 36 °C, 150rpm durante 24h. O conteúdo dos frascos foi reunido resultando um inóculo com uma biomassa celular de 0,5abs a 600nm. O experimento foi desenvolvido conforme delineamento fatorial completo 2² composto de 3 pontos centrais, 4 axiais, totalizando 11 tratamentos (Tab. 11) para a fase de produção com diferentes concentrações de óleo de arroz e Tween 80:Lecitina de soja (62,6: 37,4 m/m). Para o preparo da emulsão foi primeiramente medido a quantidade de óleo de arroz e adicionado ao meio mineral F4 (ureia: 3g/L; citrato de sódio: 4g/L; ácido cítrico: 0,2g/L; glicose: 40g/L) (OLIVEIRA, 2010), logo após, pesou-se a mistura de Tween80- Lecitina de soja e adicionou-se também ao meio de produção. O inóculo, na proporção de 20%, foi transferido para *Erlenmeyers* de 500mL contendo o meio mineral F4 já emulsionado, totalizando 200mL, que foram incubados em agitador orbital a 36 °C, 200rpm e tempo de até 72h, com retirada de amostra em 24, 48 e 72h.

A concentração de biomassa celular foi realizada através de Densidade Óptica (DO) foi determinada em espectrofotômetro GE®, modelo Ultrospec 10, onde foram lidas as absorbâncias em 600nm (DO₆₀₀), com diluição de 10x quando necessário. Para a determinação da massa celular seca (MCS), os cultivos foram transferidos para tubos Falcon e submetidos a centrifugação em centrífuga Kendro®, modelo Sorvall RC- 6, a 10000g por 15min a 4°C. O sobrenadante foi separado e o *pellet* ou biomassa seca em estufa à temperatura de 56 °C por 48h (MACAGNAN, 2014). Para a extração do polímero, a MCS foi submetida à agitação com clorofórmio na proporção 40:1(v/m) à temperatura de 58 °C. Para a separação dos restos celulares,

transferiu-se a solução para o funil de decantação e adicionou-se 40 partes de água destilada. Em seguida, foi deixada em repouso para a separação de fases e transferiu-se a fase orgânica para placa de Petri, as quais, armazenou-se em capela de exaustão de gases para a evaporação do solvente e formação do biofilme (MACAGNAN, 2014). Os filmes foram pesados para o cálculo de rendimento, que foi expresso em porcentagem. A análise estatística foi realizada com auxílio do programa Statistix 9, utilizando o Teste de Tukey a 0,05, os gráficos foram obtidos no programa Sigma Plot 11.

Tabela 11. Tratamentos utilizados para as diferentes concentrações de óleo de arroz e Twee80- Lecitina de soja em valores codificados e valores reais.

Tratamentos	Níveis codificados		Níveis Reais	
	X	Y	Óleo de arroz (mL/L)	Tween 80- Lecitina de soja (g/L)
T1	-1	-1	0	10
T2	+1	-1	10	10
T3	-1	+1	0	40
T4	+1	+1	10	40
T5	- α	0	0	25
T6	+ α	0	12,05	25
T7	0	- α	5	0
T8	0	+ α	5	40,15
T9	0	0	5	25
T10	0	0	5	25
T11	0	0	5	25

3. Resultados e Discussão

Os rendimentos obtidos para MCS em solução suplementado com óleo de arroz emulsionado com Tween80- Lecitina de soja podem ser observados na Fig. 12.

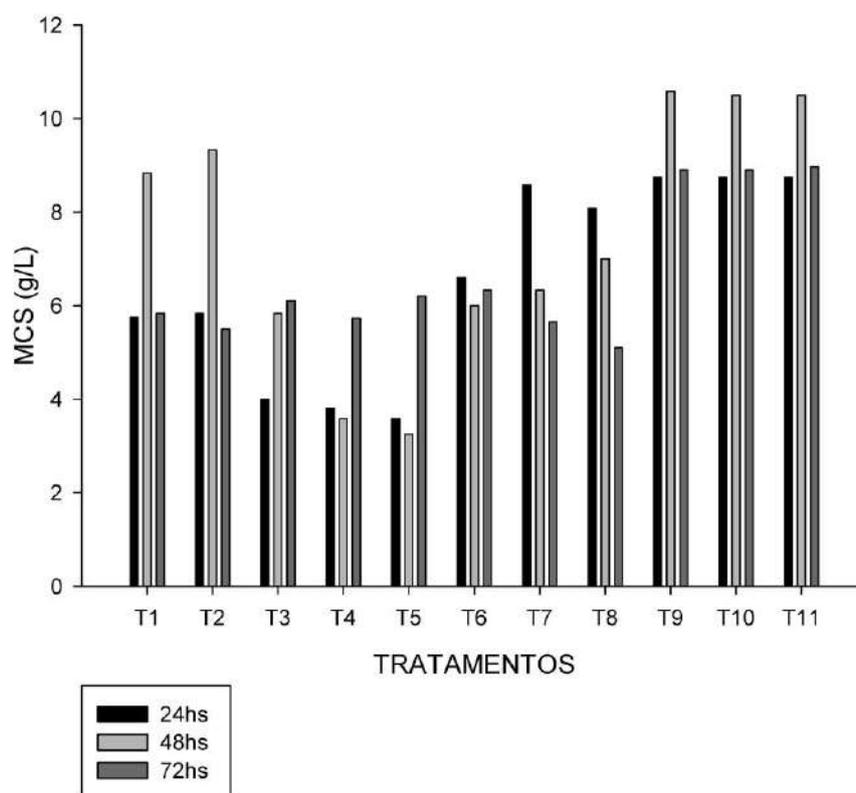


Figura 12. Massa Celular Seca em 24, 48 e 72h com temperatura de 36°C e pH 6,5.

Pela análise de MCS (Fig. 12), pode-se observar, que o melhor resultado apresentado em 24, 48 e 72h de produção, foi a combinação 5mL/L de óleo de arroz e 25g/L de Tween80:Lecitina de soja, com média de 8,75g/L, 10,53g/L e 8,92g/L, respectivamente. A combinação de 5m/L de óleo de arroz sem a adição do Tween80:Lecitina de soja apresentou um resultado considerável em 24h de produção de em média 8,59g/L.

Rodrigues (2016) ao estudar a produção de *B. megaterium* no mesmo meio mineral F4 porém sem a adição do óleo de arroz e Tween80:Lecitina de soja obteve de MCS 2,44g/L em 24h de produção, 4,91 e 5,07g/L em 48 e 72h respectivamente (RODRIGUES, 2016 (dados não publicados). Ao comparar os dois resultados, pode-se observar que o presente trabalho, também aumentou a MCS de 24 para 48h e obteve nos três tempos de produção uma massa maior.

A partir do melhor resultado de MCS, obtido com os valores do ponto central em 48h de produção, foi realizado nova produção com maior número de frascos para obter volume que permitisse a extração do polímero de

11,9g/L de MCS e 18,2% de acúmulo. A Fig. 13 mostra o filme produzido com 5mL/L de óleo de arroz e 25g/L de Tween80-Lecitina de soja.



Figura 13. Polímero produzido a partir do melhor resultado de MCS. A) Massa Celular Seca; B) Polímero extraído

Fonte. Autor, 2016.

Como observado na Fig. 13, o polímero apresentou um aspecto de pó, o mesmo ocorreu com Crochemore (2014), ao extrair o polímero produzido por *Pseudomonas sp.* CMM43 sem a necessidade de limitação nutricional que também produziu o polímero no mesmo aspecto.

Schmidt (2011) estudou sobre a suplementação do meio de produção com óleo de soja *in natura* (0,3g/L e 0,6g/L) e miniemulsionado por meio da mistura de óleo vegetal, água destilada e lecitina de soja na produção de Poli(3-hidroxibuirato) por *Cupriavidus necator* DSM 545, pode-se verificar que a concentração de 0,3g/L de óleo tanto *in natura* (61,5%) quanto miniemulsionado (64,6%) proporcionou um maior acúmulo de polímero comparado ao controle que foi de 55,5%. Uma provável explicação é que, ao miniemulsionar o óleo vegetal, as micelas de óleo ficaram com tamanho bastante reduzido, o que facilitou a hidrólise do triacilglicerol em ácido graxo (ácido oleico) pelas enzimas lipases. Comparando os resultados do autor com o presente trabalho, pode-se notar que o acúmulo de polímero obtido foi

superior ao encontrado no estudo utilizando a emulsão do Tween80:Lecitina de soja juntamente com o óleo de arroz.

Grigull e colaboradores (2008) avaliaram diferentes concentrações de ácido oleico (0 a 3,0g/L) em meio de cultivo mineral, associando glicose e frutose como fontes de carbono, para a linhagem de *Ralstonia eutropha* DSM 545. Concluíram que o ácido oleico foi consumido na fase exponencial de crescimento e o aumento da concentração desse suplemento alimentar ocasionou o aumento na taxa de crescimento bacteriano. Obtiveram rendimento de 6,96g/L de biomassa com a suplementação de 3,0g/L de ácido oleico, e nessa mesma concentração foi obtido o maior acúmulo de P(3HB) (1,16g/L/h). O presente trabalho, obteve uma maior MCS ao suplementar o meio de produção com concentração de óleo de arroz superior ao estudada pelo autor.

Araújo, 2005, ao estudar a Produção de Poli(3-hidroxitirato-co-3-hidroxicvalerato) por *Escherichia coli* recombinante em meio contendo glicose e ácido propiônico observou que, ao suplementar o meio com 1g/L de azeite de oliva que atuou como fonte de ácido oleico, a MCS aumentou de 0,56g/L para 1,1g/L e o acúmulo de PHA de 47mg/L e 80mol% para 261,5mg/L e 96mol% de P(3HB).

A influência da utilização do ácido oleico (1mL) como suplemento nutricional na produção de P(3HB-co-3HV) em culturas de *Ralstonia eutropha* DSM 545, a partir de açúcar invertido, foi estudada por Marangoni, et al. (2002). Obtiveram aumento da produtividade do polímero de 0,14 para 0,28 g/Lh e, também, aumento de polímero acumulado, de 18,3 para 28,3%, com a suplementação de ácido oleico. Schneider, et al. (2005), ao estudarem o efeito da concentração de ácido oleico sobre o crescimento e produção de P(3HB) por *Ralstonia eutropha*, em concentrações que variaram de 0, 0,3, 0,9, 1,5 e 3g/L de ácido, obtiveram uma biomassa de 7g/L na concentração de 3g/L, resultado superior ao do controle, que foi de 5g/L. Ao comparar os resultados obtidos pelo presente trabalho, nota-se que uma suplementação maior pode-se obter uma biomassa maior. O rendimento encontrado foi superior ao do presente estudo quando adicionado o ácido oleico ao meio de produção.

Ao estudarem a produção de Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) em regime de batelada, por *E. coli* XL1-Blue(pJC4) contendo genes de biossíntese de PHA de *A. latus* utilizando a glicose (20g/L) como fonte de carbono e o precursor de ácido propiônico (20mM), com ou sem suplementação de 1g/L de ácido oleico, Choi; Lee (1999), tiveram como resultado, 5,2g/L de MCS, e 61,2% de PHA, 4,6g/L de MCS e 56,8% de polímero, respectivamente. A adição do ácido oleico influenciou uma maior massa celular e acúmulo de polímero comparando com sem suplementação do mesmo. Nos resultados obtidos no presente trabalho, nota-se que independente do tratamento, os valores foram maiores que o estudo realizado. No presente estudo, a MCS obtidas nos melhores resultados foram superiores aos do autor, porém, com um rendimento de polímero inferior.

Vazin, 2008, realizou estudo sobre a biossíntese de Poli-3-hidroxi-butirato-co-Hidroxi-alcanoatos de cadeia média (P3HB-co-3HAMcl) a partir de ácidos graxos livres e óleo vegetal, por diferentes microrganismos. Para todos, a adição aumentou a massa celular seca e o acúmulo de polímero, mas a adição de acrilato nem sempre foi positivo; Para *Burkholderia cepacia* IPT-048, adicionou-se 2g/L de óleo de soja e 10mM de acrilato e obteve-se em 96h, 0,96g/L de MCS e 54,43% de P(3HB); com o uso de *Pseudomonas* IPT-066, o autor somente avaliou a produção sem a adição do acrilato, em 48h de produção, a MCS foi de 1,7g/L, tendo uma porcentagem de P(3HB) de 18,1; para *Cupriavidus necator* H16 IPT-027, com a adição de 10mM de acrilato, em 96h de produção, pode-se obter 1,07g/L de MCS e um rendimento de 40,76% de polímero. Comparando com o presente trabalho, pode-se notar que o rendimento de polímero obtido foi inferior ao estudado pelo autor.

Dalcanton e colaboradores (2010) realizaram a suplementação do meio com óleo de soja (3g/L) à base de amido de arroz hidrolisado adicionado dos nutrientes que compõem o meio mineral. Constataram que a utilização de amido hidrolisado de arroz mostrou-se uma alternativa potencial para a produção de P(3HB), e a suplementação com óleo de soja, mesmo em pequenas quantidades, levou a um aumento no acúmulo de P(3HB) (43%), comparado ao meio sem suplementação (35%). Em ambos rendimentos

encontrados pelo autor, foram superiores ao rendimento do presente trabalho em seu maior resultado.

4. Conclusão

No presente estudo, a melhor combinação para a obtenção de MCS está no ponto central do delineamento com uma média encontrada de 10,53g/L em 48h de produção, porém, o rendimento de polímero foi baixo, havendo a necessidade de maiores estudos para sua otimização como por exemplo, um novo delineamento composto central tomando como base o melhor resultado encontrado nesse estudo que foi a combinação de 5mL de óleo de arroz emulsionado com 25g/L de Tween80:Lecitina de soja.

5. Referências Bibliográficas

- ARAÚJO, D. G. de. **Produção de Poli[3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato] por *Escherichia coli* recombinante a partir de Glicose e Ácido Propiônico**. Dissertação. (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. 76p. 2005.
- CHOI, J.; LEE, S. Y.; **Appl. Microbiol. Biotechnol**, n.51, p. 13.1999.
- DALCANTON, F.; IENCZAK, J. L.; FIORESE, M. L.; ARAGÃO, G. M. F. Produção de poli(3-hidroxi-butirato) por *Cupriavidus necator* em meio hidrolisado de amido de arroz com suplementação de óleo de soja em diferentes temperaturas. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 552-556, 2010.
- DELGADO, C. C. R. **Estudo da biossíntese de poli(3-hidroxi-butirato) (P(3HB) a partir de óleo de soja**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Interunidades em Biotecnologia USO-IPT-BUTANTAN). Universidade de São Paulo, SP, 2006.
- GOMES, J.G.C.; BUENO NETTO, C.L. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v. 17, p. 24-29, 1997.
- JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides – New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, v. 28, p. 34-40, 1974.

- MACAGNAN, K. L. **Otimização de metodologia de extração química clássica de poli(3-hidroxi-butirato) sintetizado por *Ralstonia solanacearum***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 69f. 2014.
- MARANGONI, C.; FURIGO Jr. A.; ARAGÃO, G. M. F.; **Process Biochem.**, n.38, p. 137.2002.
- MOZUMDER, M. S. I.; GOORMACHTIGH, L.; GARCIA- GONZALES, L.; WEVER, H.; VOLCKE, E. I.P.; Modeling pure culture heterotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB), **Bioresource Technology**, v. 155, p. 272–280, 2014.
- PIEMOLINI, L.T. **Modelagem estrutural da PHA sintase de *C. violaceum* para estudos de mutação sítio-dirigida**. Dissertação. Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, UFSC, Florianópolis. 2004.
- SCHENEIDER, A. L.S.; CAMPENEMA, D.; GULL, V.; FORMOLO, M.; FURLAN, S.; PEZZIN, A. P. T.; ARAGÃO, G. **Efeito da concentração de ácido oleico sobre o crescimento e produção de P(3HB) por *Ralstonia eutropha***. 8º Congresso Brasileiro de Polímeros. Águas de Lindóia- SP. 2005.
- SCHMIDT, M. **Produção de Poli(3-hidroxi-butirato) por *Cupriavidus necator* DSM 545 em meio suplementado com óleo de soja miniemulsionado**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. 125p. 2011.
- SQUIO, C. R.; ARAGÃO, G. M. F. Estratégias de cultivo para produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-hidroxi-butirato) e poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) por bactérias. **Química Nova**, v. 27, p. 615, 2004.
- VAZIN, C.; **Estudo da biossíntese de Poli-3-hidroxi-butirato-co-Hidroxi-alcanoatos de cadeia média (P3HB-co-3HAMcl) a partir de ácidos graxos livres e óleo vegetal**. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT. -202f-, São Paulo. 2008.

4. Capítulo 2

Crescimento celular e acúmulo de Poli(3-hidroxiбутирато) por *Bacillus megaterium* CN3: influência do pH e adição do precursor ácido butírico.

Resumo. Como uma das alternativas de substituição dos polímeros de origem petroquímica, os bioplásticos vêm ganhando cada vez mais espaço nos projetos de pesquisa na indústria, resultando em uma melhoria significativa ao meio ambiente. Dentre os biopolímeros, podemos destacar os Polihidroxiácidoalcanoatos ou PHAs, bioplásticos totalmente biodegradáveis, utilizados por inúmeros microrganismos como reserva de carbono e energia. O objetivo desse trabalho foi estudar a influência do pH e do precursor ácido butírico na concentração da biomassa celular através de densidade óptica e acúmulo de polímero, de cultivo em cepa de *Bacillus megaterium* CN3 em meio mineral F4. Foram utilizados 11 tratamentos com diferentes concentrações de ácido butírico e pH. A melhor condição para essa produção foi obtida na combinação para a biomassa celular por DO e acúmulo de polímero 3mM de ácido butírico e pH 8 em 72h de produção.

1. Introdução

Plásticos de origem petroquímica tornaram-se, no decorrer dos anos, parte do cotidiano, em virtude de suas muitas propriedades desejáveis. São resistentes à degradação e possuem considerável durabilidade, porém, os mesmos causam danos ao meio ambiente. Em decorrência de sua alta acumulação, provocam uma taxa de milhões de toneladas por ano de lixo, acarretando em problemas ambientais graves (ARUN et al., 2006).

Nesse cenário, os plásticos oriundos da produção de biopolímeros microbianos são uma alternativa para contornar essa poluição ambiental, podendo resolver ou minimizar os problemas gerados pelos plásticos derivados de petróleo. Assim, pesquisas têm sido realizadas para o desenvolvimento de polímeros biodegradáveis.

Um dos polímeros biodegradáveis que está sendo estudado como um substituto dos polímeros de origem petroquímica é o Poli(3-hidroxiбутирато) [P(3HB)] (ANDERSON; DAWES, 1990; BRAUNEGG et al., 1998). O grande atrativo desses biomateriais é que são totalmente biodegradáveis, atóxicos e

podem ser produzidos a partir de fontes renováveis (CHANPRATEEP, 2010), resultando em uma substituição dos plásticos petroquímicos, ambientalmente vantajosa.

Os PHAs são sintetizados a partir das reservas de carbono e de energia ou materiais de armazenamento, reduzindo seu consumo de energia (CASTILHO et al., 2009). Com relação a algumas propriedades físicas, o P(3HB) pode ser comparado ao polipropileno (PP), é cristalino e com ponto de fusão em torno de 180°C (HOLMES, 1985). Eles podem ser provenientes de fontes naturais renováveis utilizadas como fonte de carbono como milho, celulose, batata e cana de açúcar, ou serem sintetizados a partir de pequenas moléculas como o ácido butírico e o ácido valérico, podem até mesmo serem derivados de fonte animal, como a quitina, a quitosana ou proteínas (BRITO et al., 2011).

Entre as bactérias Gram positivas, *Bacillus sp.* têm algumas características interessantes para serem aproveitadas na produção polimérica em escala industrial: apresentam um crescimento rápido, podem metabolizar vários substratos e toleram pressões osmóticas e temperaturas relativamente elevadas. Várias fontes de carbono têm sido usadas como substratos para *Bacillus sp.* na acumulação de PHAs de cadeia curta como P(3HB), incluindo xilose, glucose, galactose, frutose, sacarose, maltose, glicerol e manitol (FACCIN et al., 2013).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar a influência do pH e do precursor ácido butírico sobre a concentração de biomassa celular através da densidade óptica e rendimento de polímero produzida em cultivos da cepa de *Bacillus megaterium* CN3 em meio mineral F4.

2. Material e Métodos

Foi utilizado a linhagem *B. megaterium*, CN3 pertencente à coleção de culturas de microrganismos do laboratório de Biopolímeros da unidade de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas.

A linhagem CN3 foi primeiramente incubada a 36 °C, durante 24 h, em meio sólido *Nutritive Yeast Agar* (AYN) (extrato de levedura: 3g/L; extrato de malte: 3g/L; glucose: 10g/L; peptona: 5g/L) (PAGGE, 1982). Depois, as células

foram suspensas em meio líquido YM (10mL) (JEANS, 1974). Após, porções de 200mL da suspensão bacteriana foram colocados em frascos de *Erlenmeyers* de 500mL. As condições de incubação foram 36 °C, 150rpm durante 24h. O conteúdo dos frascos foi reunido resultando um inóculo com densidade óptica (DO) de 0,5 a 600nm. Para a fase de produção, foram utilizados 11 tratamentos com diferentes concentrações de ácido butírico e pH que foram ajustados com NaOH 0,1N e HCl 0,1N como mostra a Tabela 12. O inóculo, na proporção de 20%, foi transferido para frascos *Erlenmeyer* de 500mL contendo o meio líquido de produção F4 (ureia: 3g/L; ácido cítrico: 0,36g/L; citrato de sódio 4g/L; glicose: 40g/L) (OLIVEIRA, 2010), totalizando 200mL, que foram incubados em agitador orbital a 28 °C, 200rpm até 72h. As amostras foram retiradas em 24, 48 e 72h.

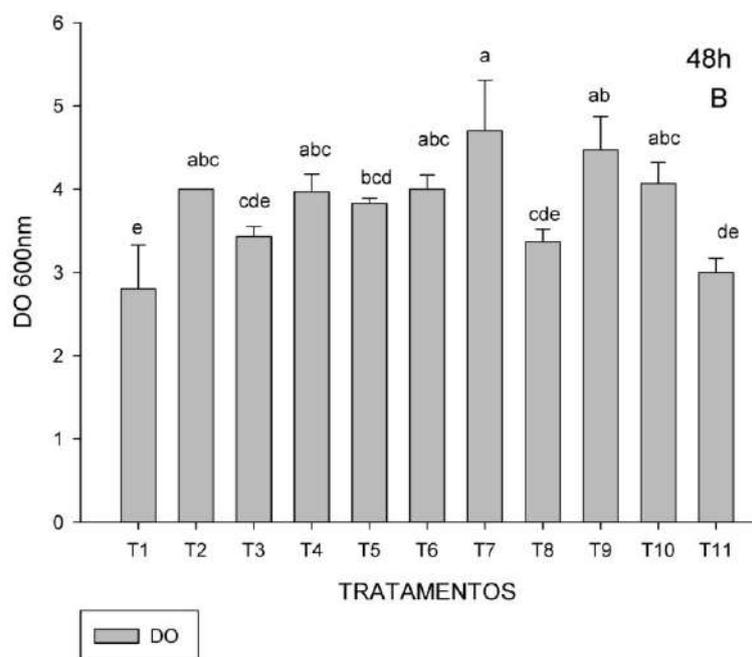
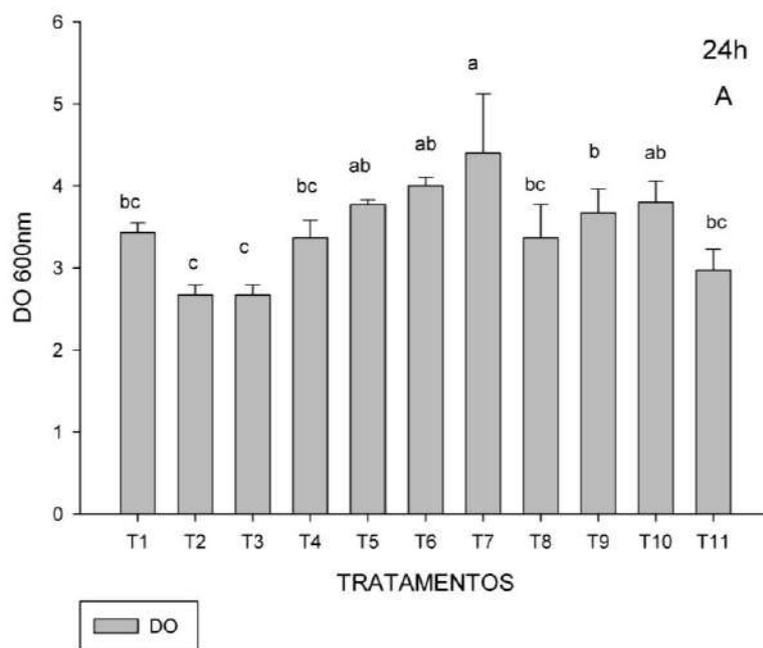
A biomassa celular foi realizada através da Densidade Óptica (DO) onde foi determinada em espectrofotômetro GE®, modelo Ultrospec 10, onde foram lidas as absorbâncias em 600nm (DO₆₀₀), com diluição de 10x quando necessário. Para a determinação da massa celular seca (MCS), os cultivos foram transferidos para tubos Falcon e submetidos a centrifugação em centrífuga Kendro®, modelo Sorvall RC- 6, a 10000g por 15min a 4°C. O sobrenadante foi separado e o *pellet* ou biomassa seca em estufa à temperatura de 56 °C por 48h (MACAGNAN, 2014). Para a extração do polímero, a MCS foi submetida à agitação com clorofórmio na proporção 40:1(v/m) à temperatura de 58 °C. Para a separação dos restos celulares, transferiu-se a solução para o funil de decantação e adicionou-se 40 partes de água destilada. Em seguida, foi deixada em repouso para a separação de fases e transferiu-se a fase orgânica para placa de Petri, as quais, armazenou-se em capela de exaustão de gases para a evaporação do solvente e formação do biofilme (MACAGNAN, 2014). Após sua recuperação, os filmes foram pesados para o cálculo de rendimento através da equação 1, que foi expresso em porcentagem. A análise estatística foi realizada com auxílio do programa Statistix 9, utilizando o Teste de Tukey a 0,05, os gráficos foram obtidos no programa Sigma Plot 11.

Tabela 12. Concentrações de ácido butírico e pH nos diferentes tratamentos em níveis codificados e níveis reais.

Tratamentos	Níveis Codificados		Níveis Reais	
	X	Y	Ác (mM)	pH
1	-1	-1	0	5
2	+1	-1	3	5
3	-1	+1	0	8
4	+1	+1	3	8
5	- α	0	0	6,5
6	+ α	0	3,615	6,5
7	0	- α	1,5	4,4
8	0	+ α	1,5	8,6
9	0	0	1,5	6,5
10	0	0	1,5	6,5
11	0	0	1,5	6,5

3. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos para a concentração de biomassa celular por Densidade Óptica (DO) dos diferentes tratamentos utilizando o precursor ácido butírico e diferentes pH, podem ser observados nas figuras Fig. 14 (a, b, c).



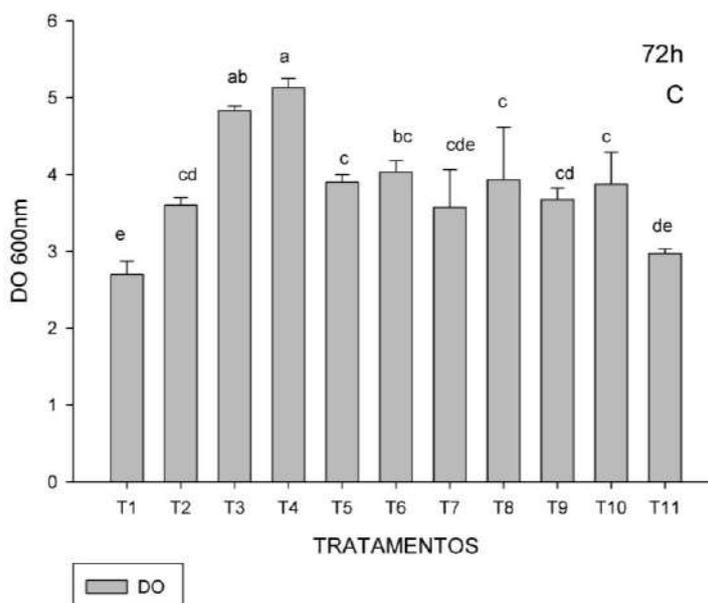


Figura 14. DO em 24h (A); pH 4,4; 36 °C, 200rpm, 48h (B); pH 4,4; 36 °C; 200rpm e 72h (C); pH 8; 36°C; 200rpm.

De acordo com os resultados aferidos, presentes na Fig. 14, pode-se observar que em 24h e 48h de produção, a maior DO foi alcançada no tratamento 7 que combina 1,5mM de ácido butírico e pH 4,4, com $4,40 \pm 0,72$ abs, valor superior DO do inóculo, que foi de 0,5abs. Porém, em 72h, o maior resultado, $5,13 \pm 0,12$ abs, foi decorrente do tratamento 4, com 3mM de ácido butírico e pH 8.

Pode-se observar quando é utilizado o pH 8, o crescimento da bactéria é mais lento, tendo o seu melhor resultado em 72h, porém, ao submeter um pH menor (4,4) o crescimento é acelerado, com os resultados em 24 e 48h. Já em pH 6,5 o crescimento encontrou-se mediano e mais constante.

A Figura abaixo apresenta os dados obtidos para o acúmulo de polímero nas 24, 48 e 72hs de produção.

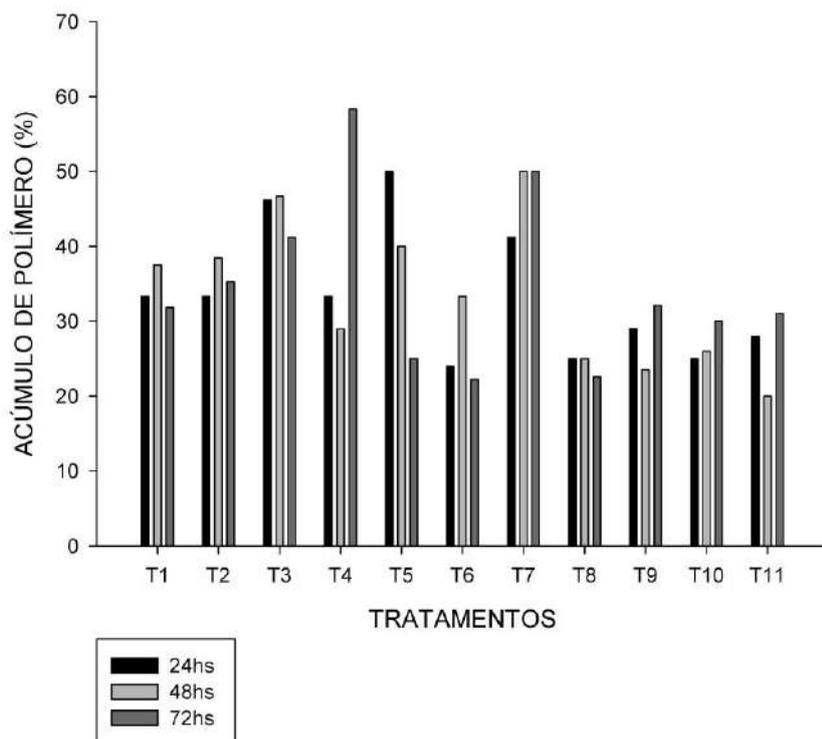


Figura 15. Rendimento de Polímero em 24h; sem adição de ácido; pH 6,5; 36 °C; 200rpm, 48h; 1,5mM de ácido; pH 4,4; 36 °C; 200rpm e 72h; 3mM de ácido; pH 8; 36°C; 200rpm.

No acúmulo de polímero (Fig. 15) analisado nesse estudo, pode-se observar que o melhor resultado em 24h de produção pertence ao tratamento 5 que não possui a adição de ácido com o pH 6,5, que atingiu 50%. Em 48h, o tratamento 7 que combina 1,5mM de ácido butírico e pH 4,4 obteve o melhor rendimento com 50%, já em 72h o Tratamento 4 com 3mM de ácido butírico e pH 8 atingiu o melhor resultado com 58,3% de rendimento de polímero.

Em relação à produção do polímero parece que o pH teve maior influência, de modo geral, que a adição do ácido butírico. Entretanto, a adição de 1,5mM de ácido, combinado com os pH menores parece favorável, em 24 e 48h de acordo com a reação de formação do biopolímero.

Araújo (2005) ao estudar a produção de Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) por *Escherichia coli* recombinante a partir de glicose e ácido propiônico com concentração de 10; 15; 20 e 25mM obteve uma biomassa celular com DO de 0,064; 0,040; 0,040 e 0,006 respectivamente. A utilização do ácido propiônico (10mM) juntamente com a glicose (20g/L), teve acúmulo de 47mg/L de PHA, correspondendo a 80mol% de P(3HB) e MCS de 0,56. Sem a

adição do ácido, os resultados foram superiores tanto em acúmulo de polímero quanto MCS, 1630mg/L (100mol%) e 2,67g/L. A adição do ácido propiônico acabou inibindo o crescimento da bactéria, apenas a concentração de 10mM apresentou a menor inibição. Comparando os resultados obtidos no presente trabalho, nota-se que a concentração da biomassa celular utilizando o ácido butírico nas diferentes variações de pH obteve um resultado superior ao encontrado pelo autor.

Vazin e colaboradores (2008), ao realizar um estudo sobre a biossíntese de Poli-3-hidroxi-butirato-co-Hidroxi-alcenoatos de cadeia média (P3HB-co-3HAMcl) a partir de ácidos graxos livres e óleo vegetal, utilizando o *Cupriavidus necator* DSM545 IPT-026, obteve elevado acúmulo de polímero (70,85%) de polímero ao utilizar o ácido hexanóico (2g/L) e 10mM de acrilato em um tempo longo (96h); a MCS, entretanto, foi extremamente baixa (0,48g/L). No mesmo tempo, porém com uma concentração de 30mM de acrilato, acúmulo de polímero de 20,54% e os valores de MCS foram ainda menores (0,37g/L). Ao utilizar o ácido hexanóico, sem a adição do acrilato em 96h de produção, obtiveram 53,47% de rendimento e 0,35g/L de MCS. Os mesmos autores, utilizaram ácido palmítico (2g/L), em 96h de produção, o acúmulo de polímero de 60,33%, a MCS 1,71g/L, porém ao adicionar 10mM de acrilato, o rendimento menor (10,36%), a MCS foi de 0,20g/L. A utilização do ácido capríico reduziu os valores, assim como a adição concomitante de acrilato. Já a adição do ácido palmítico foi benéfica, mas não sua combinação com o acrilato. Comparando os resultados com os do presente estudo, pode-se observar que os valores obtidos em relação ao rendimento de polímero, utilizando o ácido hexanóico com 30mM de acrilato e do ácido palmítico com 10mM, a taxa relatada foi menor que a encontrada nos três tratamentos, que foram de 50 e 58,3%.

Ao estudarem sobre a estratégia de adição de fosfato durante a fase de produção que aumenta o acúmulo de Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-Hidroxi-valerato) por *Ralstonia eutropha*, Squio et al. (2003), adicionou durante a fase de produção, no meio, uma concentração menor que 1g/L de ácido propiônico com o objetivo de produzirem o copolímero. Como fonte de carbono, utilizou uma solução estéril de glicose: frutose (1:1) e obtiveram como resultado um rendimento de 35,7% em 26,8h de produção com

velocidade na fase de produção de $0\text{gXrl}^{-1}\text{h}^{-1}$; $0,02\text{gXrl}^{-1}\text{h}^{-1}$ em 27,3h, o acúmulo de polímero de 45,3%; $0,07\text{gXrl}^{-1}\text{h}^{-1}$ em um tempo de 22,5h, rendimento de 27%. A adição do fosfato juntamente com o ácido propiônico aumentou o acúmulo do P(3HB-co-3HV) com a melhor velocidade de produção de $0,02\text{gXrl}^{-1}\text{h}^{-1}$, valores estes menores que o presente estudo.

Ao estudarem as estratégias de produção de Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) por *Rashtonia eutropha*, utilizando substrato de baixo custo e ácido propiônico, Marangoni (2000) utilizou como fonte de carbono soro de leite (30g/L de glicose). O soro de leite possui apenas 5% de lactose, com isso viu-se a necessidade de adicionar açúcar invertido (30g/L). A produção do polímero passou a ser observado em 17h de produção, com um acúmulo de 37%. Pelos resultados, é possível a utilização do soro de leite como fonte de carbono e que o ácido propiônico utilizado auxiliou na produção do copolímero. Comparando com o presente trabalho, o resultado obtido foi abaixo do que a adição do ácido butírico.

Kulpreecha e colaboradores (2009) avaliaram o efeito do pH (6,0; 7,0 e 8,0) e da concentração de oxigênio dissolvido (OD) (40, 60 e 80% de saturação) no meio de cultivo para fermentação em batelada de *Bacillus megaterium* BA-019. Para o rendimento de biomassa o melhor resultado (9,7g/L) foi obtido na fermentação sem controle de pH e com nível de OD saturado de 60%, porém não diferiu estatisticamente do resultado obtido com pH 8,0 e saturação de 80% (9,5g/L). Considerando o rendimento de P(3HB) acumulado na célula, a combinação de pH 7,0 e saturação de 60% permitindo acúmulo de 61,6% em relação a massa celular seca. Isto pode ser devido ao fato de o pH 7,0 ser o valor ótimo das enzimas chaves na via biossintética de P(3HB), para esse microrganismo. Portanto, o pH mais elevado ou mais baixo do que o ideal, a atividade enzimática diminui. Relata-se que as mudanças de pH reduzem o desempenho da cultura e o valor inicial do pH pode afetar a disponibilidade de elementos traços necessários para a bactéria no meio de cultura (GROTHER et al., 1999). Resultados esse acima do que foi obtido no presente trabalho.

Ramadas et al. (2009), além de testar diferentes resíduos agro-industriais como fonte de carbono, testaram diferentes valores de pH (5,0 a 8,0) para o cultivo da linhagem *Bacillus sphaericus* 5149. A alteração inicial do

pH no meio de cultivo mostrou uma forte influência sobre a produção de P(3HB). Mesmo uma pequena diferença de pH do ponto ideal causou uma redução brusca no acúmulo. Nesse trabalho, o meio com pH inicial de 7,5 resultou no aumento máximo de P(3HB) de 25%. A alteração drástica na produção parece ser devido ao efeito do pH inicial na biodisponibilidade de oligoelementos. Com um pH menor e a adição do ácido butírico como precursor obteve-se um rendimento maior que encontrado pelo autor.

Martínez e colaboradores (2004) avaliaram o efeito do pH (6,0; 6,8 e 7,4), da agitação (300 e 700rpm) e da aeração (0,25 e 1vvm) para o microrganismo *Azospirillum brasilense* cepa 7 utilizando extrato de tomate como fonte de carbono. Obtiveram o rendimento máximo de biomassa de 1,67g/L e P(3HB) de 0,16g/L, em pH de 6,8. Agitação de 500rpm e aeração de 0,5vvm se mostrou a melhor combinação para biomassa (1,2g/L), porém para obter maior rendimento de P(3HB) (4,9g/L) o cultivo foi mantido em maior agitação (700rpm) e menor aeração (0,25vvm).

4. Conclusão

Os melhores resultados para a concentração de biomassa celular por DO e acúmulo de polímero encontram-se na combinação de 3mM de ácido butírico e pH 8 em 72h de produção, tornando-se necessário uma maior pesquisa em torno dessa combinação através de um novo delineamento tomando como ponto central a melhor combinação deste trabalho.

5. Referências Bibliográficas

- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxybutyrate. **Microbiol. Rev.**, n. 54, p. 450-472, 1990.
- ARAÚJO, D. G. de. **Produção de Poli[3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato] por *Escherichia coli* recombinante a partir de Glicose e Ácido Propiônico**. Dissertação. (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC- 76f.-, Santa Catarina, 2005.
- ARUN, A.; MURRUGAPPAN, R. N.; DAVID RAVINDRAN, A. D.; VEERAMANIKANDAN, V.; BALAJI, S. Utilization of various industrial wasters

for the production of poly-b- hydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes eutrophus*. **Afr. J. Biotechnol.**, n. 5, p. 1524-1527, 2006.

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. **J. Biotechnol.**, n. 65, p. 127-161, 1998.

BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M.; MÉLO, T. J. A.; Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes; **Revista eletrônica de materiais e processos**, v.6, n.2, p. 127-139, 2011.

CASTILHO, L. R.; MITCHELL, D. A.; FREIRE, D. M.G.; Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5996–6009, 2009.

CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.110, p. 621-632, 2010.

FACCIN, D. J. L.; RECH, R.; SECCHI, A. R.; CARDOZO, N. S. M.; AYUB, M. A. Z.; Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 420–425, 2013.

JEANS, A. Extracellular microbial polysaccharides- New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, v. 28, p. 34-40, 1975.

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

MACAGNAN, K. L. **Otimização de metodologia de extração química clássica de poli(3-hidroxibutirato) sintetizado por *Ralstonia solanacearum***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas-UFPel- 69f.-, Pelotas, 2014.

MARANGONI, C. **Estudo de estratégias de produção de Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por *Ralstonia eutropha* utilizando substratos de baixo custo e ácido propriônico**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós- Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC- 220f.-, Santa Catarina, 2000.

SQUIO, C. R.; ARAGÃO, G. M. F. Estratégias de cultivo para produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-hidroxi-butirato) e poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) por bactérias. **Química Nova**, v. 27, p. 615, 2004.

VAZIN, C.; **Estudo da biossíntese de Poli-3-hidroxi-butirato-co-Hidroxi-alcenoatos de cadeia média (P3HB-co-3HAMcl) a partir de ácidos graxos livres e óleo vegetal**. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT. São Paulo. 2008.

4. Considerações finais

Comparando as adições de diferentes lipídeos ao meio de produção para obtenção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* CN3, a melhor combinação para a obtenção de MCS a partir de óleo de arroz e Twee80-Lecitina de soja no ponto central do delineamento, já com a e alteração do pH ácido butírico acúmulo de polímero encontram-se na combinação de 3mM de ácido butírico e pH 8 em 72h de produção, tornando-se necessário uma maior pesquisa em torno dessas combinações como um novo delineamento tomando com variações iniciais os melhores resultados obtidos nesse trabalho.

5. Referências Bibliográficas

- ABERLPE. Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais; **Panorama nos resíduos industriais no Brasil**, pag. 116, 2012.
- ABIPLAST 2013. Disponível em: <<http://www.abiplast.org.br/>>, acesso em 12/01/2016.
- AGNELLI, J. A. M. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, n. 4, v. 9, 1996.
- 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.
- AKIYAMA, M.; TAIMA, Y.; DOI, Y.; EUR. J. Production of poly (3-hydroxyalkanoates) by a bacterium of the genus *Alcaligenes* utilizing long-chain fatty acids. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 37, p. 698, 1992.
- ALBERTS, B. **Molecular biology of the cell**. 5th. Ed. New York: Garland Science, 2008.
- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology Reviews**, v. 54, p. 450-472, 1990.
- ARAÚJO, D. G. de. **Produção de Poli[3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato] por *Escherichia coli* recombinante a partir de Glicose e Ácido Propiônico**. Dissertação. (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC- 76f- Santa Catarina, 2005.
- ARRUDA, J. C. de; **Produção do Biopolímero do tipo Poli(3-hidroxibutirato) por microrganismo recombinante em substrato de baixo custo: análise de possíveis alterações em parâmetros físico- químicos**; Monografia (Conclusão do curso). Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC; Centro de Ciências Físicas e Matemáticas- 34f- Santa Catarina, 2003.
- ARUN, A.; MURUGAPPAN, R. N.; DAVID RAVINDRAN, A. D.; VEERAMANIKANDAN, V.; BALAJI, S. Utilization of various industrial wasters for the production of poly-b- hydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes eutrophus*. **Afr. J. Biotechnol.**, n. 5, p. 1524-1527, 2006.
- ASTAR, J.; GRUYS, K.J. Biodegradable polymer: Biopol®. In: STEINBÜCHEL, A. & DOI, Y. **Biopolymers**, v. 4. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.

- AVEROUS, L.; BOQUILLON, N. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviour. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p. 111-122, 2004.
- BABEL, W.; ACKERMANN, J. U.; BREUER, U.; STEINBÜCHEL, A. Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB)Biopolyesters: Springer Berlin/ Heidelberg. **Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology**, p. 125-157, 2001.
- BARBA, A. et. al. **Materias primas para La fabricación de soportes de baldosas cerámicas. Castellón.** Instituto de Tecnología Cerámica – AICE, 1997.
- BARBOSA, M.; ESPINOSA, H. A.; MALAGÓN, R. D.; MORENO, S. N. Producción de Poli-b-hidroxibutirato (PH, p., - B) por *Ralstonia eutropha* ATCC17697. **Universitas Scientiarum**, v. 10, n. 1, p. 45-54, 2005.
- BECHER, P. **Emulsions: Theory and Practice.** American Chemical Society Monograph, n. 135, Reinhold, New York. 1957.
- BENGTSSON, S.; PISCO, A. R.; REIS, M. A. M.; LEMOS, P. C. Production of polyhydroxyalkanoates from fermented sugarcane molasses by a mixed culture enriched in glycogen accumulating organisms. **J Biotechnol.**, v. 145, p. 253–263, 2010.
- BIOMER. Disponível em: <<http://www.biomer.de/IndexE.html>>, acesso em 15/04/2015.
- BLOEMBERGEN, S.; HOLDEN, D. A.; BLUHM, T. L.; HAMER, G. K.; MARCHESSAULT, R. H.; Stereoregularity in synthetic β -hydroxybutyrate and β -hydroxyvalerate homopolyesters. **Macromolecules**, v. 22, n. 4, p. 1656-1663, 1989.
- BORAH, B.; THAKUR, P. S.; NIGAM, J.N. The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. **Journal of Applied Microbiology**, n. 92, p. 776–783, 2002.
- BORMAM, E. J.; LEIBNER, M.; BEER, B. Growth-associated production of polyhydroxybutyric acid by *Azobacter beijerinckii* from organic nitrogen substrate. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 49, p.84-844, 1998.
- BORGES, C. D.; MOREIRA, A. N.; MOREIRA, A. S.; DEL PINO, F. A. B.; VENDRUSCOLO, C. T. Caracterização de biopolímeros produzidos por

Beijerinckia sp. 7070 em diferentes tempos de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 24, v. 3, p. 327-332, 2004.

BORMANN, E. J. Stoichiometrically calculated yields of the growth-associated production of polyhydroxybutyrate in bactéria. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 18, p. 1437-1442, 2000.

BORQUE, D., POMERLEAU, Y., GROLEAU, D. High cell density production of polyb-hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens* production of high molecular mass PHB. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 44, p. 367–376, 1995.

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.

BRASIL. BNDES. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set3804.pdf>, acesso em 18/01/2016.

BRASIL. MMA; Ministério do Meio Ambiente; Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/responsabilidade-socioambiental/producao-e-consumo-sustentavel/saco-e-um-saco/saiba-mais>>, acesso em 15/03/2015.

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. **J. Biotechnol.**, n. 65, p. 127-161, 1998.

BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M.; MÉLO, T. J. A. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes; **Revista eletrônica de materiais e processos**, v.6, n. 2, p. 127-139, 2011.

BUCCI, D. Z. Avaliação de embalagens de PHB (poli (ácido 3hidroxibutírico)) para alimentos. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção). Programa de Pós Graduação em Engenharia de Produção. Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC- 166f.- Santa Catarina, 2003.

BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economies. **Trends in Biotechnology**, v. 5, p. 246-250, 1987.

CALIK, P.; YILGÖR, P.; AYHAN, P.; DEMIR, A. S. Oxygen transfer effects on recombinant benzaldehyde lyase production. **Chem Eng Sci.**, v. 59, p. 5075–83, 2004.

CALVÃO, P. S. **Obtenção e caracterização de misturas do polímero degradável P[3HB] e seu copolímero P[3HB-co-3HV] com elastômeros.** Tese (Doutorado em Engenharia). Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo-150f-, São Paulo, 2009.

CANEVAROLO, S. V. **Ciência dos Polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros.** São Paulo: ArtLiber Editora, p. 183, 2002.

CANTO, E. L. do. **Plástico: Bem supérfluo ou mal necessário?** 8. ed. Moderna, São Paulo, 2001.

CARMIGNAN, F. **Desenvolvimento de microesferas de ibuprofeno a partir dos biopolímeros polihidroxialcanoatos. Estudo da influência das características físico-químicas das microesferas sobre o perfil de liberação do fármaco e degradação das partículas.** Dissertação (Mestrado em Farmácia). Programa de Pós-Graduação em Farmácia. Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC- 151f.-, Santa Catarina, 2006.

CASTILHO, L. R.; MITCHELL, D. A.; FREIRE, D. M.G.; Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation; **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5996–6009, 2009.

CAVALHEIRO, J. M.B.T.; de ALMEIDA, M. C. M. D.; GRANDFILS, C.; da FONSECA, M.M.R. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 509–515, 2009.

CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 621-632, 2010.

CHEN, G. Q. Production and Application of Microbial Polyhydroxyalkanoates. In: CHIPELLINI, E.; SOLARO, R. **Biodegradable Polymers and Plastics.** London: Springer, p. 155-166, 2003.

CHEN, G. G. Q. Polyhydroxyalkanoates. In: Smith, R. **Biodegradable Polymers for Industrial Application.** Cambridge: Woodhead Publishing, 2005.

CHOI, J.; LEE, S. Y.; **Appl. Microbiol. Biotechnol**, n.51, p. 13.1999.

CHOI, K. H.; CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. Comparative evaluation of hydrodynamic and gas-liquid mass transfer characteristics in bubble column and airlift slurry reactors, **Chem.Eng. J. Biochem. Eng. J.**, v. 62, p. 223–229, 1996.

COLBORN T.– How research has succeeded and failed to translate science into policy: endocrinological effects on wildlife. **Environ Health Perspect.**, v.103 p.81-5. 1995

CROCHEMORE, A. G.; MATTOS, M. L. T.; VENDRUSCOLO, C. T.; CASTRO, L. A. S.; MOREIRA, A. S. Identification of pesticide-degrading *Pseudomonas* strains as poly- β -hydroxybutyrate producers. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 85, p. 15144-15149, 2012.

DALCANTON, F.; IENCZAK, J. L.; FIORESE, M. L.; ARAGÃO, G. M. F. Produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator* em meio hidrolisado de amido de arroz com suplementação de óleo de soja em diferentes temperaturas. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 552-556, 2010.

DAWES, E. A.; SENIOR, P. J. The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Micro-organisms. **Advances in Microbial Physiology**: Academic Press, p. 135-266, 1973.

DELGADO, C. C. R. **Estudo da biossíntese de poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)) a partir de óleo de soja**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Interunidades em Biotecnologia USO-IPT-BUTANTAN). Universidade de São Paulo, SP, 2006.

DOI, Y. M.; KITAMURA, S.; ABE, H. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyhexanoate). **Macromolecules**, v.28, p. 4822-4828, 1995.

DUARTE, M.A. T.; JÚLIO, C. F.; MARTINS, E. S.; PEZZIN, S. H. Estudo da compactação a frio de poli(3-hidroxibutirato) – morfologia e resistência à compressão. **Revista Matéria**, v. 9, p. 386-391, 2004.

FACCIN, D. J. L. **Avaliação de condições de cultivo para aumento de produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* e modelagem do bioprocesso**. Tese (Doutorado em Engenharia). Programa de Pós- Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, -160f-Porto Alegre, 2012.

FACCIN, D. J. L.; RECH, R.; SECCHI, A. R.; CARDOZO, N. S. M.; AYUB, M. A. Z. Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 3, p. 420-425, 2013.

FLICKINGER, M. C.; DREW, S. W. **The encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation**. New York: John Wiley & Sons, 1999.

FORMOLO, M.C.; VOGELSANGER, J. R. N.; SCHNEIDER, A.L.; FURLAN, S.A.; ARAGÃO, G.M.F.; PEZZIN, S.H.; PEZZIN, A.P.T. Biossíntese de polímero biodegradável: caracterização térmica e espectroscópica. **Anais do VII Congresso Brasileiro de Polímeros**. Belo Horizonte. Associação Brasileira de Polímeros. 2003.

FRANCHETTI, S.M.; MARCONATO, J.C. Biodegradable polymers - A partial way for decreasing the amount of plastic waste. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.

FULL, T. D.; JUNG D.O.; MADIGAN, M.T. Production of poly--hydroxyalkanoates from soy molasses oligosaccharides by new, rapidly growing *Bacillus* species. **Lett Appl Microbiol.**, v. 43, p. 377–84, 2006.

GARCIA, M. C. F. **Proposta de um processo de extração de poli(3-hidroxi-butirato) produzido por *Cupriavidus necator* e seu efeito sobre as características do polímero**. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC- 161f.-, Santa Catarina, 2006.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E.; SANTOS, V. E. Oxygen transfer and uptake rates during xanthan production. **Enzyme Microb Technol.**, v. 27, p. 680–90, 2000.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. **Biotechnol Adv.**, v. 27, p. 153–76, 2009.

GOMES, J. G. C.; BUENO NETTO, C. L. - Produção de Plásticos Biodegradáveis por Bactérias. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v. 17, p. 24-29, 1997.

GOMEZ, J.G.C.; 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. **Review Microbiology**, v. 28, p. 43-48, 1997.

GOUDA, M. K.; SWELLAM, A. E.; OMAR, S. H. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. **Microbiological Research**, v. 156, p. 201–207, 2001.

GOULD, G. W.; RICHARD, K. R. BACTERIA| **Bacterial Endospores Encyclopedia of Food Microbiology**. Oxford: Elsevier, p. 168-173, 1999.

GOPFERICH, A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. **Biomaterials**. v. 17, p. 103-114, 1996.

GRAEBLING, D.; MULLER, R.; PALIERNE, J. F.; Linear viscoelasticity of incompatible polymer blends in the melt relation with interfacial properties. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 3, n. 4, p. 1525, 1993.

GRIGULL, V. H.; SILVA, D. D.; GARCIA, M. C. F.; FURLAN, S. A.; PEZZIN, A. P.T.; SCHENEIDER, A. L. S.; AGRAGÃO, G. F. Production of Poly(3-hydroxybutyrate) from oleic acid by *Ralstonia eutropha*. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 46, n. 2, p. 223-228, 2008.

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

GURIEFF, N.; LANT, P. Comparative life cycle assessment and financial analysis of mixed culture polyhydroxyalkanoate production. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3393–3403, 2007.

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

HORI, K.; MARSUDI, S.; UNNO, H. Simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 78, p.699-707, 2002.

HUANG, S. J. Mat. Sci. **Pure Appl. Chem.** n. 42, pag. 493, 1995.

IMEBI. Instituto de Medicina Biomolecular. Disponível em: <<http://www.imebi.com.br/hormonio.php>>. Acesso em: 07/03/2016.

IPT. Instituto de Pesquisa e Tecnologia. Biodiversidade. Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/biodiversidade/bio15.htm>. Acesso em: 20/03/2015.

HUISMAN, G. W.; WONINK, E.; MEIMA, R.; KAZEMIER, B.; TERPSTRA, P.; WITHOLT, B. Metabolism of Poly(3-Hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans* - Identification and Sequences of Genes and Function of the Encoded Proteins in the Synthesis and Degradation of PHA. **Journal of Biological Chemistry**, n. 266, p. 2191-2198, 1991.

JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides – New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, v. 28, p. 34-40, 1974.

JENDROSSEK, D.; SCHIRMER, A.; SCHLEGEL, H. G. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. **Appl Microbiology Biotechnology**, n. 46, p. 451-463, 1996.

KANJANACHUMPOL, P. KULPREECHA, S.; TOLIENG, V.; THONGCHUL, N. Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 6, n. 10, p. 1463-1467, 2013.

KESSLER, B.; WEUSTHUIS, R.; WITHOLT, B.; EGGINK, G. Production of Microbial Polyesters: Fermentation and Downstream Process. **Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology**, v. 71, p. 159-182, 2001.

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

KIRBAS, Z. **Environ. Contamin. Toxicol.** n. 63, p. 335, 1999.

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

KRUGER, C. L. **Seleção de linhagens de *Bacillus* produtoras de Polihidroxiálcanoatos a partir de resíduo do processamento de mandioca.** Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC,- 114f.-, Santa Catarina, 2009.

KULPREECHA, S.; BOONRUANGTHAVORN, A.; MEKSIRIPORN, B.; THONGCHUL, N.; Inexpensive fed-batch cultivation for high for poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 3, p. 240-245, 2009.

- KUNASUNDARI, B.; SUDESH, K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. **Express Polymer Letters**, v. 5, n. 7, p. 620–634, 2011.
- 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, p. 135-176, 1988.
- LAW, K. H.; CHENG, Y. C.; LEUNG, Y. C.; LO, W.H.; CHUA, H.; YU, H.F. Construction of recombinant *Bacillus subtilis* strains for polyhydroxyalkanoates synthesis. **Biochemical Engineering Journal**, v.16, p. 203-208, 2003.
- LEE, W. H.; LOO, C. Y.; NOMURA, C. T.; SUDESH, K. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. **Bioresource Technol.**, v. 99, p. 6844–6851, 2008.
- LEE, S. Y.; CHOI, J. L. Production and degradation of polyhydroxyalkanoate in waste environment. **Waste Management**, v. 19, p. 133-139, 1999.
- LEE, S. Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 1-14, 1996
- LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 1-14, 1996a.
- LEE, S. Y. Plastic bacteria?: Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Trends Biotechnology**. v. 14, p. 431-438, 1996b.
- LEE, S. Y. Poly(3-hydroxybutyrate) extrusion by cells of recombinant *Escherichia coli*. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 6, p. 147-149, 1996c.
- LIEBERGESELL, M.; RAHALKAR, S.; STEINBÜCHEL, A. Analysis of the *Thiocapsa pfennigii* polyhydroxyalkanoate synthase: subcloning, molecular characterization and generation of hybrid synthases with the corresponding *Chromatium vinosum* enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 186-94, 2000.
- LÓPEZ, J.; NARANJO, J.; HIGUITA, J.; CUBITTO, M.; CARDONA, C.; VILLAR, M. Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 17, n. 2, p. 250-258, 2012.
- LUENGO, J. M.; GARCÍA, B.; SANDOVAL, A.; NAHARROY, G.; OLIVEIRA, E. R. Bioplastics from microorganisms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 251–260, 2003.

- LUVIZETTO, D. J. **Cultivo da bactéria *Bacillus megaterium* para a produção do biopolímero Poli(3-hidroxi-butirato) e modelagem matemática do bioprocesso**. Dissertação (Mestrado em Engenharia). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS-119f.-, Porto Alegre, 2007.
- MACAGNAN, K. L. **Otimização de metodologia de extração química clássica de poli(3-hidroxi-butirato) sintetizado por *Ralstonia solanacearum***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas-UFPeL- 61f.-, Pelotas, 2014.
- MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W.; Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, p. 21-53, 1999.
- MANO, E.B.; MENDES, L.C. **Introdução a polímeros**. 2ªEd. Edgar Blücher Ltda. São Paulo, 1999.
- MARANGONI, C. **Estudo de estratégias de produção de Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) por *Ralstonia eutropha* utilizando substratos de baixo custo e ácido propiônico**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina-UFSC- 220f.-, Santa Catarina, 2000.
- MARANGONI, C.; FURIGO Jr. A.; ARAGÃO, G. M. F.; **Process Biochem.**, v.38, p. 137, 2002.
- MARTIN, D. P.; WILLIAMS, S. F.; Medical applications of 4-polyhydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 2, p. 97-105, 2003.
- MARTÍNEZ, J.; RODRÍGUEZ, M.; FERNÁNDEZ, A. L.; VILLAVARDE, M. J.; LÓPEZ, A.; MARÍN, D.; NÚÑEZ, R.; GALEGO, N.; CARBALLO, E. M.; Produccion de polihidroxi-alcanoatos em bacterias diazotrofas. I. Influencia de la aeracion em la sintesis de poli B hidroxi-butirato em *Azospirillum brasilense* Cepa 7. **Revista Biologia**, v.18, n.1, p.87-95, 2004.
- MCCOOL, G. J.; CANNON, M. C. PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*. **Journal of Bacteriology**, 183, p. 4235-43, 2001.

- MCCOOL, G.J.; FERNANDEZ, T.; LI, N.; CANNON, M.C. Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*. **FEMS Microbiology Letters**, v.138, p. 41-48, 1996.
- MERRICK, J. M.; STEGER, R.; DOMBROSKI, D. Hydrolysis of native poly(polyhydroxybutyrate) granules (PHB), crystalline PHB and artificial amorphous PHB granules by intracellular and extracellular depolymerases. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 25, p. 129-134, 1999.
- MIRTHA, E.F.; LOPEZ, N. I.; MENDEZ, B. S.; FURST, U. P.; STEINBÜCHEL, A. Isolation and partial characterization of *Bacillus megaterium* mutants deficient in poly(3-hydroxybutyrate) synthesis. **Can. J. Microbiol.**, n. 41, v. 1, p. 77-79, 1995.
- MOZUMDER, M. S. I.; GOORMACHTIGH, L.; GARCIA-GONZALES, L.; WEVER, H.; VOLCKE, E. I.P. Modeling pure culture heterotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB). **Bioresource Technology**, v. 155, p. 272-280, 2014.
- NARANJO, J. M.; POSADA, J. A.; HIGUITA, J. C.; CARDONA, C. A. Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. **Bioresource Technol.**, v. 133, p. 38-44, 2013.
- NATH, A.; DIXIT, M.; BANDIYA, A.; CHAVDA, S.; DESAI, A.J. Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 5749-5755, 2008
- NODA, I.; SATKOWSKI, M. M.; DOWREY, A. E.; MARCOTT, C. Polymer Alloys of Nodax Copolymers and Poly(lactic acid). **Macromolecular Bioscience**, v. 4, p. 269-275, 2004.
- NONATO, R. V.; MANTELATO, P. E.; ROSSELL, C. E. V. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. **Appl. Microbiol Biotechnol.**, v. 57, n. 9, p. 1-5, 2001.
- OLIVEIRA, F.C.; FREIRE, D.M.G.; CASTILHO, L.R. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by solid-state fermentation with *Ralstonia eutropha*. **Biotechnol. Letter.**, v.26, n.24, p.1851-1855, 2004.
- OLIVEIRA, C. **Produção de polihidroxibutirato: bioprospecção de Beijerinckia sp. da coleção de bactérias do Laboratório de Biopolímeros do CDTec - UFPel.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de

Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas-UFPel-96f.-, Pelotas, 2010.

OMAR, S.; RAYES, A.; EQAAB, A.; VOB, I.; STEINBÜCHEL, A. Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1119-1123, 2001.

PACE, G.N. Production of extracellular microbial polysaccharides. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 15, p. 41-70, 1980.

PADILHA, F. **F.Estudo da compartimentalização das enzimas para a produção de biopolímeros por *Beijerinckia sp.* 7070**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia em Alimentos) - Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos, Universidade Federal de Pelotas- UFPel-95f.- Pelotas, 1997.

PIATI; T. M.; RODRIGUES, R. A. F. **Plásticos: Características, usos, produção e impacto ambiental**. p. 505. EDUFAL- Maceió/ Alagoas, 2005.

PIEMOLINI, L. T. **Modelagem estrutural da PHA sintase de *C. violaceum* para estudos de mutação sítio-dirigida**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC-91f.-, Santa Catarina, 2004.

PLASTIC EUROPE 2012. Disponível em: <<http://www.plasticseurope.org/Document/plastics-the-facts-2012.aspx>>, acesso em 12/01/2016.

POIRIER, Y.; NAWRATH, C.; SOMERVILLE, C. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers in bacteria and plants. **Biotechnology**, v.13, p.142-150, 1995.

POSADA, J. A.; NARANJO, J. M.; LÓPEZ, J. A.; HIGUITA, J. C.; CARDONA, C. A. Design and analysis of poly-3-polyhydroxybutyrate production process from crude glycerol. **Process Biochemistry**, v. 97, n.1, p. 41-50, 2010.

PÖTTER, M.; MADKOUR, M.; MAYER, F.; STEINBÜCHEL, A. Regulation of phasing expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H 16. **Microbiology**, v.148, p.2413-2426, 2002.

POUTON, C. W., AKHTAR, S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potencial in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 18, p. 133 – 162, 1996.

QUILLAGUAMÁN, J.; GUZMÁN, H.; VAN-TOUC, D.; HATTI-KAUL, R. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. **Appl. Micro. and Biotec.**, v. 85, n. 6, p. 1687-1696, 2010.

RAMADAS, N. H.; SINGH, S. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Polyhydroxybutyrate production using agro-industrial residue as substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 52, n. 1, p. 17-23, 2009.

RAMSAY, J. A.; BERGER, E.; VOYER, R.; CHAVARIER, C.; RAMSAY, B. A. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. **Biotechnology Technonology**, v.8, p. 589-594, 1994.

REDDY, S.; THIRUMALA, M.; MAHMOOD, S. A novel *Bacillus* sp. Accumulating poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from a single carbon substrate. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 837-843, 2009.

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

REHM, B. H.; Polyester synthases: natural catalysts for plastics. **Biochemistry Journal**, 376, p. 15-33, 2003.

REHM, B. H. A. Genetics and biochemistry of polyhydroxyalkanoate granule, self-assembly: The key role of polyester synthases. **Biotechnology. Letters**, v. 28, p. 207-213, 2006.

RODRIGUES, A. A.; SANTOS, B. C.; MACAGNAN, K. L.; ALVES, M. I.; MOURA, A. B.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C.T. **Poli-3hidroxibutirato: identificação molecular de linhagens bacterianas positivas para síntese de bioplástico**. Anais do XXII Congresso Latinoamericano de Microbiología y 4 Congreso Colombiano de Microbiología, Cartagena, Colômbia, 2014.

RODRIGUES-CONTRERAS, A.; KOLLER, M.; DIAS, M. M. S.; CALAFELL-MONFORTE M.; BRAUNEGG G.; MARQUÉS-CALVOA, M. S. Influence of glycerol on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* and *Burkholderia sacchari*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 94, p. 50-57, 2015.

- ROSA, S.M.L. **Estudo das propriedades de compósitos de polipropileno com casca de arroz.**Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais. Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS- 92f.-, Porto Alegre, 2007.
- RUSENDI, D.; SHEPPARD, J. D. Hydrolysis of potato processing waste for the production of poly- β -hydroxybutyrate. **Bioresour. Technol.**, v. 54, p. 191, 1995.
- SARIKAVA, E.; HIGASA, T.; ADACHI, M.; MIKAMI, B. Comparison of degradation abilities of α - and β -amylases on raw starch granules. **Process Biochem.**, v. 35, p. 711-715, 2000.
- SATHIYANARAYANAN, G.; KIRAN, G. S.; SELVIN, J.; SAIBABA, G.; Optimization of polyhydroxybutyrate production by marine *Bacillus megaterium* MSBN04 under solid state culture.**International Journal of Biological Macromolecules**,v. 60, p. 253– 261, 2013.
- SCHENEIDER, A. L.S.; CAMPENEMA, D.; GULL, V.; FORMOLO, M.; FURLAN, S.; PEZZIN, A. P. T.; ARAGÃO, G. **Efeito da concentração de ácido oleico sobre o crescimento e produção de P(3HB) por Ralstonia eutropha.** 8º Congresso Brasileiro de Polímeros. Águas de Lindóia- SP. 2005.
- SCHIMDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.**Em Biotecnologia Industrial**; Edgard Blücher, v. 1, cap. 6, São Paulo, 2001.
- SCHMIDT, M. **Produção de Poli(3-hidroxi-butirato) por *Cupriavidus necator* DSM 545 em meio suplementado com óleo de soja miniemulsionado.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC- 125f.-, Santa Catarina, 2011.
- SCOTT, G. Green Polymers. **Polymer Degradation and Stability**, v. 68, p. 1-7, 2000.
- SERAFIM, L. S.; LEMOS, P. C.; REIS, M. A. M. Produção de bioplásticos por culturas microbianas mistas. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia**, v. 76, p. 16-21, 2003.
- SHEN, L.; HAUFE. J.; PATEL, M. K. **Product overview and Market projection of emerging bio- based plastics.** PRO-BIT 2009. Copernicus Institute for Sustainable Development and Innovation Utrecht University. June. 2009.
- SILVA, L. F.; TACIRO, M. K.; MICHELIN, M. E.; CARTER, J. M.; PRADELLA, J. G. C.; GOMEZ, J. G. C. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria

from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 31, p. 245–254, 2004.

SILVA, T. A. de L.; LUNA, J. M. de.; FILHO, M. A. M.; TAMBOURGI, E. B.; TAKAKI, G. M. de C. Produção de biosurfactante de *Pseudomonas fluorescens* UCP1514 utilizando milhocina como substrato. **Exacta**, v. 8, n. 1, p. 19-26, 2010.

SLATER, S.C.; VOIGE, W.H.; DENNIS, D. E. Cloning and expression. In *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. **Journal of Bacteriology**, n. 170, p. 4431-4436, 1988.

SLEPECKY, R. A.; LAW, J. H. Synthesis and degradation of poly-3-hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium*. **Journal of Bacteriology**, v. 82, p. 37-42, 1961.

SOLAIMAN, D.K.; ASHBY, R.D.; LICCIARDELLO, G.; CATARA, V. Genetic organization of pha gene locus affects phaC expression, poly(hydroxyalkanoates) composition and granule morphology in *Pseudomonas corrugate*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 111-120, 2008.

SONG, J. J.; YOON, S.C. Biosynthesis of novel aromatic copolyesters from insoluble 11-phenoxyundecanoic acid by *Pseudomonas putida* BM01. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 536–544, 1996.

SORRENTINO, A.; GORRASI, G.; VITTORIA, V. Potential perspectives of bionanocomposites for food packaging applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, p. 84-95, 2007.

SOUZA, E. L.; GONÇALVES, F. A.; FONSECA, G. G.; **Avaliação do crescimento de *Burkholderia sacchari* em diferentes açúcares**; II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – II SIGERA; 15-17 de Março de 2011; Foz do Iguaçu- PR.

SOUZA, P.P.; SILVA, G.G.; AMARAL, L.O.F. Transição Vítrea. **Química Nova**, n. 20, 2004.

SQUIO, C. R.; ARAGAO, G. M. F. de. Estratégias de cultivo para produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-Hidroxibutirato) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por bactérias. **Química Nova**, v. 27, n. 4, 2004.

- STEINBÜCHEL, A.; EVERSLOH, L.T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 81-96, 2003.
- STEINBÜCHEL, A.; FÜCHTENBUSCH B. Bacterial and other biological systems for polyester production. **Trends in Biotechnology**. v. 16, n.10, p. 419-427, 1998.
- STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, 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 propriets of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, v. 25, p. 207-215, 2000.
- SUN,Z; RAMSEY, J. A.; GUAY, M.; RAMSEY, B. A. Automated feeding strategies for high-cell-density fed-batch cultivation of *Pseudomonas putida* KT2440. **Appl. Microbiol. Biot.**, v. 71, p. 423–43, 2006.
- SUN,Z; RAMSEY, J. A.; GUAY, M.; RAMSEY, B. A. Carbon limited fed-batch production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates from nonanoic acid by *Pseudomonas putida* KT2440. **Appl Microbiol Biot.**, v. 74, p. 69–77, 2007.
- SURIYAMONGKOL, P.; WESELAKE, R.; NARINE, S.; MOLONEY, M.; SHAH, S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms na plants. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 148-175, 2007.
- TAKEDA, M.; MATSUOKA, H.; HAMANA, H.; HIKUMA, M. Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate by *Sphaerotilus natans*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, n. 43, p. 31–34, 1995.
- TAN, L.K. P.; KUMAR, K. S.; THEANMALAR, M.; GAN, S. N.; GORDON III, B. Saponified palm kernel oil and its major free fatty acids as carbon substrates for the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* PGA1. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, n. 47, p. 207– 211, 1997.
- TIAN, P. Y.; SHANG, L. A.; REN, H.; MI, Y.; FAN, D. D.; JIANG, M. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Current research and development. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.5, p. 709-714, 2009.
- TSUGE, T. Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n.6, p. 579-584, 2002.

- TYO, K. E. J.; FISCHER, C. R.; SIMEON, F.; STEPHANOPOULOS, G. Analysis of polyhydroxybutyrate flux limitations by systematic genetic and metabolic perturbations. **Metabolic Engineering**, v, 12, n. 3, p.187-195, 2010.
- VALAPPIL, S. P, BOCCACCINI, A. R, BUCKE C, ROY I. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 91, p.1–17, 2007.
- VANDAMME, P.; COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International Journal System. Evolo Microbiology**, v. 54, p. 2285-2289, 2004.
- VAN-THOUC, D.; QUILLAGUAMAN, J.; MAMO, G.; MATTIASSON, B. Utilization of agriculture residues for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1. **Appl. Microbiol.**, v. 104, p. 420-428, 2007.
- VARY, P. S. Prime time for *Bacillus megaterium*. **Microbiology**, v. 140, n. 5, p. 1001-1013, 1994.
- VAZIN, C.; **Estudo da biossíntese de Poli-3-hidroxibutirato-co-Hidroxialcanoatos de cadeia média (P3HB-co-3HAMcl) a partir de ácidos graxos livres e óleo vegetal**. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT. -202f-, São Paulo. 2008.
- VELHO, L.; VELHO, P. The development of a sugar based plastic in Brazil. The role of Government Schemes in fostering. **Public Sector Research-Industry Relations**, 2006.
- VERLINDEN, R.A.J.; HILL, D.J.; KENWARD, M.A.; WILLIAMS, C.D.; RADECKA, I. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, p.1437-1449, 2007.
- VIJAYENDRA, S.; RASTOGI, N.; SHAMALA, T.; ANIL KUMAR, P.; KSHAMA, L.; JPSHI, G. Optimization of polyhydroxybutyrate production by *Bacillus* sp. CFR 256 with corn steep liquor as a nitrogen source. **Indian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 170-175, 2007.
- 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.

- WILLIAMS, S. F.; MARTIN, D. P.; HOROWITZ, D. M.; PEOPLES, O. PHA applications: addressing the price performance issue. I. Tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 111-121, 1999.
- WU, Q.; HUANG, H.; HU, G. H.; CHEN, J.; HO, K. P.; CHEN, G. Q. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 80, p. 111–118, 2001.
- YAMANE, T. Yield of poly-D(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: A theoretical study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, n. 1, p. 165-170, 1993.
- YAZDANIE, S. S.; GANZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Curr Opin Biotechnol.**, v. 18, n. 3, p. 213-219, 2007.
- YU, J. Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. **J. Biotechnol.**, v. 86, p. 105, 2001.
- ZHANG, H.; OBIAS, V.; GONYER, K.; DENNIS, D.; Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella strains*. **Appl. Environ. Microbiol.**, n. 60, p. 1198–1205.1994
- ZINN, M.; WITHOLT, B.; EGLI, T. Occurrence synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 53, n.1, p. 5-11, 2001.

