

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

**Andréa Lima dos Santos Schneider**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E BIODEGRADAÇÃO  
DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO - P(3HB) DE  
*Ralstonia eutropha* E BLENDA DE P(3HB)/PCL  
(POLI-ε-CAPROLACTONA)**

**Florianópolis**

2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Andréa Lima dos Santos Schneider**

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E BIODEGRADAÇÃO  
DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO - P(3HB) DE  
*Ralstonia eutropha* E BLENDA DE P(3HB)/PCL  
(POLI-ε-CAPROLACTONA)

Trabalho apresentado como parte dos  
requisitos para a obtenção do título de  
Doutor em Engenharia Química na  
Universidade Federal de Santa Catarina,  
Área de concentração: Engenharia Química

Orientador: Dra. Gláucia Maria Falcão Aragão  
Co-orientador: Dra. Sandra Aparecida Furlan

## Termo de Aprovação

### Andréa Lima dos Santos Schneider

**Título do trabalho:** Síntese, caracterização e biodegradação de poli-3-hidroxi-butirato - P(3HB) de *Ralstonia eutropha* e blendas de P(3HB) e poli-ε-caprolactona (PCL)

Apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química na Universidade Federal de Santa Catarina

**Área de concentração:** Engenharia Química

**Data de aprovação:** 28 de abril de 2006

### Componentes da Banca Examinadora

Orientador: Dra. Gláucia M. Falcão Aragão Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC Assinatura: _____	Co-orientador: Dra. Sandra Aparecida Furlan Instituição: Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE Assinatura: _____
Profª Dra. Ana Paula Testa Pezzin Instituição: Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE Assinatura: _____	Profª Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek Instituição: Pontifícia Universidade Católica – Sorocaba – SP Assinatura: _____
Prof. Dr. Agenor Fúrigo Júnior Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC Assinatura: _____	Prof. Dra. Regina Vasconcellos Antonio Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC Assinatura: _____

*...O amor é paciente, é benigno,  
O amor não é invejoso...  
Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.  
O amor nunca falha.*

(Cor. 13:1-8)

## **Dedicatória**

*Gian, João Pedro, Giuliano Augusto, Maria Gabriela e Maria Isabela,*  
perdão pelos momentos roubados..., o cinema que passou,  
o jogo que não assisti, o mergulho que não dei,  
o passeio que não fiz, o filme que não vi,  
a mulher que faltou, a mamãe que não fui...,  
mas, sobretudo, obrigada pelo amor sincero e inocente.

*Odmar e Mylcéa, Ralf e Didi,*

Isto só foi possível por vocês estarem incondicionalmente ao meu lado, sempre presentes,  
dispostos a dar todo o amor sem nada esperar em troca.

Obrigada, Senhor, por fazer nascer em mim, a cada manhã, a certeza de que eu conseguiria...

## Agradecimentos

Profª Gláucia,

Você foi mais do que compreensiva, paciente e amiga. Seu conhecimento e sua experiência foram determinantes para esse trabalho. Você destravou portas e mostrou caminhos... Obrigada

Ana Paula e Michele,

“Há grandes homens, que fazem com que todos se sintam pequenos, mas o verdadeiro grande homem é aquele que faz com que todos se sintam grandes”. Vocês foram os dois anjos da guarda que Deus colocou em meu caminho. Deixo aqui registrado todo o meu agradecimento e gratidão, a minha amizade, o meu carinho pelos ensinamentos e pela dedicação desinteressada de vocês. Guardarei em meu coração para todo o sempre...

Sandra,

Você é a grande responsável por mais este desafio, sempre apostando e confiando no meu trabalho. Perto ou longe você sempre me inspira...

Profª Eliana Duek

Obrigada pelas análises de DSC que contribuíram para enriquecer o trabalho.

Regina,

“Amigo é coisa para se guardar do lado esquerdo do peito”... Você, amiga confidente dos sentimentos mais íntimos, “quase” juntas chegamos ao fim de mais uma etapa. Obrigada por você estar comigo nessa caminhada.

Reny,

“Tu és eternamente responsável por tudo àquilo que cativas”. (Saint Exupere) Obrigada pelo ombro amigo nos momentos difíceis e incertos e pelo grande apoio na reta final com a correção dos erros cometidos à nossa língua mãe.

Gi, Bea, Milena,

“Quando você realmente deseja algo, todo o universo conspira para que aquilo aconteça.” (Paulo Coelho) Sou grata pela ajuda de vocês nas noitadas, análises, incentivos, estímulo... Muito obrigada.

Edivilson e Agenor,

Ao longo dessa etapa vocês sempre tiveram compreensão das dificuldades encontradas e me incentivaram com palavras e atitudes. Obrigada

Kaká, Vítor e Delne,

“Ninguém é tão bom que não precise de ninguém”. Obrigada por vocês não medirem esforços e terem trabalhado muito para que hoje eu pudesse estar aqui.

Débora Capanema,

“Um dia devemos parar de sonhar e de algum modo, partir” (Amyr Klink). Que você continue iluminando a todos com seu sorriso. Fique com Deus.

Aos membros da banca

Obrigada por aceitarem avaliar este trabalho contribuindo com suas sugestões.

## Lista de figuras

### Capítulo 1

<b>Figura 1.1</b> Ciclo fechado de produção de polihidroxialcanoato (PHA) .....	26
<b>Figura 1.2</b> Fórmula química estrutural da maioria dos polihidroxialcanoatos (PHAs) produzidos por bactérias. PHAs são comumente compostos por (R)- $\beta$ -hidroxiácidos graxos, onde o grupo R varia de acordo com a tabela 1.1 .....	27
<b>Figura 1.3</b> Grânulos do polímero biodegradável P(3HB) no interior das bactérias .....	28
<b>Figura 1.4</b> Estrutura da molécula de PCL .....	42
<b>Figura 1.5</b> Desenho esquemático demonstrando como ocorre a produção de PHA por <i>Ralstonia eutropha</i> .....	46
<b>Figura 1.6</b> Rota metabólica da síntese e degradação de poli(3-hidroxi butirato) em <i>Ralstonia eutropha</i> ..	53
<b>Figura 1.7</b> Via metabólica no suprimento de monômeros de hidroxialcanoato para síntese de PHA .....	54
<b>Figura 1.8</b> Modelo esquemático para hidrólise enzimática de uma ligação éster em várias seqüências pela PHB extracelular despolimerase .....	64

### Capítulo 2

<b>Figura 2.1</b> Dispositivo experimental de cultivo em biorreator .....	75
<b>Figura 2.2</b> Fluxograma do processamento das amostras para os ensaios conduzidos em frascos de Erlenmeyer .....	76
<b>Figura 2.3</b> Fluxograma do processamento das amostras para os ensaios conduzidos em biorreator .....	77
<b>Figura 2.4</b> Cuba de vidro para formação do filme por evaporação lenta de solvente .....	85

### Capítulo 3

<b>Figura 3.1</b> Crescimento celular de <i>Ralstonia eutropha</i> (expresso em $\ln \text{ abs/abs}_0$ ) em função do tempo com diferentes quantidades de ácido oléico utilizado como suplemento a 30°C .....	94
<b>Figura 3.2</b> Crescimento celular de <i>Ralstonia eutropha</i> a 30°C com 3,0 g/L de ácido oléico.....	94
<b>Figura 3.3</b> Crescimento celular de <i>Ralstonia eutropha</i> expresso em $\ln \text{ abs/abs}_0$ em função do tempo para diferentes quantidades de ácido oléico utilizado como suplemento a 37°C.....	96
<b>Figura 3.4</b> Consumo de substrato por <i>Ralstonia eutropha</i> em função do tempo para diferentes concentrações de ácido oléico utilizado como suplemento .....	98
<b>Figura 3.5</b> Produção de P(3HB) por <i>Ralstonia eutropha</i> em função da concentração de ácido oléico utilizado como suplemento para as temperaturas de 30°C (pontilhado) e 37°C (listado).....	99
<b>Figura 3.6</b> Produção de P(3HB) por <i>Ralstonia eutropha</i> a 30°C (pontilhado) e 37°C (listado) após 24h de cultivo, em função da concentração do ácido oléico .....	100
<b>Figura 3.7</b> Evolução do crescimento celular (expresso em $\ln \text{ abs/abs}_0$ ) de <i>Ralstonia eutropha</i> em função do tempo de cultivo, da temperatura e da adição ou não de ácido oléico.....	101
<b>Figura 3.8</b> Evolução da produção de P(3HB) em função do tempo de cultivo, da temperatura e da adição ou não de ácido oléico.....	101
<b>Figura 3.9</b> BT1. Evolução em cultivo de batelada alimentada a 30°C.....	107
<b>Figura 3.10</b> BT2. Evolução em cultivo de batelada alimentada a 37°C.....	107
<b>Figura 3.11</b> BT3. Evolução em cultivo de batelada alimentada a 30°C na fase de crescimento e 37°C na fase de produção.....	108
<b>Figura 3.12</b> BT4. Evolução em cultivo de batelada alimentada a 30°C na fase de crescimento com adição de ácido oléico e 37°C na fase de produção.....	108
<b>Figura 3.13</b> BT5. Evolução em cultivo de batelada alimentada a 30°C na fase de crescimento, com adição de 3,0g/L de ácido oléico, e 37°C na fase de produção, com adição de 3,0g/L de ácido oléico .....	109
<b>Figura 3.14</b> BT6. Evolução em cultivo batelada alimentada a 30°C na fase de crescimento, com adição de óleo de canola (equivalente em 3,0g/L de ácido oléico), e 37°C na fase de produção, com adição de óleo de canola (equivalente em 3,0g/L de ácido oléico) .....	109
<b>Figura 3.15</b> Evolução da biomassa residual para as temperaturas de 30°C e 37°C e para mudança de temperatura de 30°C $\rightarrow$ 37°C no final da fase de crescimento para os ensaios conduzidos em biorreator .....	112

## Capítulo 4

<b>Figura 4.1</b> Espectro de FT-IR para o polímero sintetizado por <i>R. eutropha</i> sem adição de ácido oléico..	120
<b>Figura 4.2.</b> Espectro de FT-IR para o polímero obtido industrialmente.....	120
<b>Figura 4.3.</b> Difratoograma de raios-X do polímero sintetizado por <i>Ralstonia eutropha</i> .....	121
<b>Figura 4.4</b> Curvas de DSC para (a) polímero sintetizado por <i>R. eutropha</i> sem adição de ácido oléico e (b) polímero obtido industrialmente.....	122
<b>Figura 4.5</b> Curvas termogravimétricas para (a) polímero sintetizado por <i>Ralstonia eutropha</i> e (b) polímero obtido industrialmente.....	126
<b>Figura 4.6</b> Curvas de DSC das amostras de P(3HB) (2 <sup>o</sup> aquecimento), em função do teor de ácido oléico, mostrando a $T_g$ (*) .....	127
<b>Figura 4.7.</b> Curvas termogravimétricas do P(3HB) sintetizado por <i>Ralstonia eutropha</i> em função da concentração do ácido oléico comparadas com o P(3HB) controle (sem ácido oléico).....	130

## Capítulo 5

<b>Figura 5.1.</b> Análise visual dos filmes de P(3HB) sintetizados com diferentes concentrações de ácido oléico a partir de <i>Ralstonia eutropha</i> .....	134
<b>Figura 5.2.</b> Curvas de DSC das amostras de P(3HB) sem adição de ácido oléico (controle) em função do tempo de degradação em solo mostrando a $T_g$ (*).....	139
<b>Figura 5.3.</b> Curvas de DSC das amostras de P(3HB) com 0,3g/L de ácido oléico em função do tempo de degradação mostrando a $T_g$ (*) .....	141
<b>Figura 5.4.</b> Curvas de DSC das amostras de P(3HB) com 0,9g/L de ácido oléico em função do tempo de degradação, mostrando a $T_g$ (*).....	142
<b>Figura 5.5.</b> Curvas de DSC das amostras de P(3HB) com 1,5g/L de ácido oléico em função do tempo de degradação, mostrando a $T_g$ (*).....	143
<b>Figura 5.6</b> Curvas de DSC das amostras de P(3HB) com 3,0g/L de ácido oléico em função do tempo de degradação mostrando a $T_g$ (*).....	143
<b>Figura 5.7.</b> Comparação entre as curvas de DSC das amostras degradadas por 7 dias (a) e por 14 dias (b) em função da concentração de ácido oléico.....	145
<b>Figura 5.8.</b> Evolução da temperatura de fusão ( $T_m$ ) e entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ) dos filmes de P(3HB) em função da concentração de ácido oléico no cultivo de <i>Ralstonia eutropha</i> para 7 dias de degradação em solo.....	146
<b>Figura 5.9.</b> Curvas termogravimétricas do P(3HB) sintetizado por <i>Ralstonia eutropha</i> sem adição de ácido oléico (controle) em função do tempo de biodegradação em solo. a) 0 dia; b) 7 dias, c) 14 dias, d) 21 dias.....	147
<b>Figura 5.10.</b> Curvas termogravimétricas do P(3HB) sintetizado por <i>Ralstonia eutropha</i> com adição de 0,9g/L de ácido oléico em função do tempo de biodegradação em solo. a) 0 dia; b) 7 dias, c) 14 dias.....	148
<b>Figura 5.11.</b> Espectro de FT-IR para o polímero sintetizado por <i>Ralstonia eutropha</i> contendo 0g/L de ácido oléico (amostra controle) no meio de cultura.....	150
<b>Figura 5.12.</b> Espectro de FT-IR para o polímero sintetizado por <i>Ralstonia eutropha</i> contendo 3,0g/L de ácido oléico no meio de cultura.....	151

## Capítulo 6

<b>Figura 6.1.</b> Curvas de DSC para as blendas P(3HB)/PCL no 2 <sup>o</sup> aquecimento.....	155
<b>Figura 6.2</b> Curvas de TGA para os homopolímeros e as blendas P(3HB)/PCL .....	158
<b>Figura 6.3.</b> Micrografias de SEM (superfície) de blendas P(3HB)/PCL.....	161
<b>Figura 6.4.</b> Micrografias de SEM (superfície de fratura) de blendas P(3HB)/PCL.....	163
<b>Figura 6.5.</b> Fotos das blendas P(3HB)/PCL biodegradadas em solo após 7, 14, 21, 34 e 62 dias.....	165
<b>Figura 6.6.</b> Curvas de DSC para o homopolímero P(3HB) após biodegradação em solo .....	166
<b>Figura 6.7.</b> Curvas de DSC para as blendas P(3HB)/PCL 20/80 após biodegradação em solo.....	167
<b>Figura 6.8.</b> Curvas de DSC para as blendas P(3HB)/PCL 50/50 após biodegradação em solo.....	168
<b>Figura 6.9.</b> Curvas de DSC para as blendas P(3HB)/PCL 80/20 após biodegradação em solo .....	169
<b>Figura 6.10.</b> Curvas de DSC para o homopolímero PCL após biodegradação em solo .....	171
<b>Figura 6.11.</b> Curvas de TGA para o homopolímero P(3HB) após biodegradação em solo.....	172
<b>Figura 6.12.</b> Curvas de TGA para as blendas P(3HB)/PCL 20/80 após biodegradação em solo .....	173

<b>Figura 6.13</b> Curvas de TGA para as blendas P(3HB)/PCL 50/50 após biodegradação em solo.....	174
<b>Figura 6.14</b> Curvas de TGA para as blendas P(3HB)/PCL 80/20 após biodegradação em solo .....	175
<b>Figura 6.15</b> Curvas de TGA para o homopolímero PCL após biodegradação em solo.....	176
<b>Figura 6.16</b> Micrografias de SEM dos homopolímeros P(3HB) e PCL após 7 dias de biodegradação em solo.....	177
<b>Figura 6.17</b> Micrografias de SEM das blendas P(3HB)/PCL 80/20 após 7 dias de biodegradação em solo.....	178
<b>Figura 6.18</b> Micrografias de SEM das blendas P(3HB)/PCL 20/80 após 7 dias de biodegradação em solo.....	178
<b>Figura 6.19</b> Micrografias de SEM das blendas P(3HB) e P(3HB)/PCL 80/20 respectivamente após 14 dias de biodegradação em solo.....	179
<b>Figura 6.20</b> Micrografias de SEM (superfície) de blendas P(3HB)/PCL após 34 dias de biodegradação em solo.....	180
<b>Anexo – 1 Curvas de correlação</b>	
<b>Figura A.1</b> Curva de correlação abs x peso seco para células de <i>Ralstonia eutropha</i> .....	196
<b>Figura A.2</b> Curva típica padrão para determinação da concentração de P(3HB) .....	196
<b>Figura A.3</b> Curva típica padrão para determinação da concentração de substrato .....	196
<b>Figura A.4</b> Curva típica padrão para determinação da concentração de proteína .....	196
<b>Anexo 2 – Cultivo de <i>Ralstonia eutropha</i> para ensaios conduzidos em frascos agitados com adição de ácido oléico sobre o crescimento celular nas temperaturas de 30°C e 37°C</b>	
<b>Figura A 2.1</b> Crescimento celular (expresso em absorvância) (? ), consumo de substrato (?) e ln abs (Δ) a 30°C sem adição de ácido oléico .....	198
<b>Figura A 2.2</b> Crescimento celular (expresso em absorvância) (? ), consumo de substrato (?) e ln abs (Δ) a 30°C com 0,3g/L de ácido oléico .....	198
<b>Figura A 2.3</b> Crescimento celular (expresso em absorvância) (? ), consumo de substrato (?) e ln abs (Δ) a 30°C com 0,9g/L de ácido oléico .....	198
<b>Figura A 2.4</b> Crescimento celular (expresso em absorvância) (? ), consumo de substrato (?) e ln abs (Δ) a 30°C com 1,5g/L de ácido oléico .....	199
<b>Figura A 2.5</b> Crescimento celular (expresso em absorvância) (? ), consumo de substrato (?) e ln abs (Δ) a 30°C com 3,0g/L de ácido oléico .....	199
<b>Figura A 2.6</b> Crescimento celular (expresso em absorvância) (? ), consumo de substrato (?) e ln abs (Δ) a 37°C sem adição de ácido oléico .....	200
<b>Figura A 2.7</b> Crescimento celular (expresso em absorvância) (? ), consumo de substrato (?) e ln abs (Δ) a 37°C com 0,3g/L de ácido oléico .....	200
<b>Figura A2.8</b> Crescimento celular (expresso em absorvância) (? ), consumo de substrato(?) e ln abs (Δ) a 37°C com 0,9g/L de ácido oléico .....	200
<b>Figura A2.9</b> Crescimento celular (expresso em absorvância) (? ), consumo de substrato(?) e ln abs (Δ) a 37°C com 1,5g/L de ácido oléico .....	201
<b>Figura A2.10</b> Crescimento celular (expresso em absorvância) (? ), consumo de substrato(?) e ln abs (Δ) a 37°C com 3,0g/L de ácido oléico.....	201
<b>Anexo 3 - Cultivo de <i>Ralstonia eutropha</i> para ensaios conduzidos em frascos agitados com adição de ácido oléico sobre a fase de produção do polímero nas temperaturas de 30°C e 37°C</b>	
<b>Figura A 3.1</b> Crescimento celular (expresso em absorvância) (? ), consumo de substrato (?), P(3HB) (●) e ln abs (Δ) a 30°C sem adição de ácido oléico .....	203
<b>Figura A3.2</b> Crescimento celular (expresso em absorvância) (? ), consumo de substrato(?), P(3HB) (●) e ln abs (Δ) a 30°C com pulso de 0,3 g/L de ácido oléico em 14h de cultivo .....	203
<b>Figura A3.3</b> Crescimento celular (expresso em absorvância) (? ), consumo de substrato (?), P(3HB) (●) e ln abs (Δ) a 30°C com pulso de 0,9 g/L de ácido oléico em 14h de cultivo .....	203
<b>Figura A3.4</b> Crescimento celular (expresso em absorvância) (? ), consumo de substrato(?), P(3HB) (●) e ln abs (Δ) a 30°C com pulso de 1,5 g/L de ácido oléico em 14h de cultivo .....	204

<b>Figura A3.5</b> Crescimento celular (expresso em absorbância) (? ), consumo de substrato(?), P(3HB) (●) e ln abs (Δ) a 30°C com pulso de 3,0 g/L de ácido oléico em 14h de cultivo .....	204
<b>Figura A3.6</b> Crescimento celular (expresso em absorbância) (? ), consumo de substrato(?) e ln abs (Δ) a 37°C sem adição de ácido oléico .....	205
<b>Figura A3.7</b> Crescimento celular (expresso em absorbância) (? ), consumo de substrato(?) e ln abs (Δ) a 37°C com pulso de 0,3 g/L de ácido oléico em 14h de cultivo .....	205
<b>Figura A3.8</b> Crescimento celular (expresso em absorbância) (? ), consumo de substrato(?) e ln abs (Δ) a 37°C com pulso de 0,9 g/L de ácido oléico em 14h de cultivo .....	205
<b>Figura A3.9</b> Crescimento celular (expresso em absorbância) (? ), consumo de substrato(?) e ln abs (Δ) a 37°C com pulso de 1,5 g/L de ácido oléico em 14h de cultivo .....	206
<b>Figura A3.10</b> Crescimento celular (expresso em absorbância) (? ), consumo de substrato(?) e ln abs (Δ) a 37°C com pulso de 3,0 g/L de ácido oléico em 14h de cultivo .....	206
<b>Anexo 4 - Cultivo de <i>Ralstonia eutropha</i> para ensaios conduzidos em biorreator em diferentes estratégias de adição de ácido oléico e temperatura de processo</b>	
<b>Figura A4.1 BT1.</b> Evolução da pressão parcial de oxigênio e consumo de substrato em ensaios conduzidos sem adição de ácido oléico e temperatura constante de 30°C .....	208
<b>Figura A4.2 BT2.</b> Evolução da pressão parcial de oxigênio e consumo de substrato em ensaios conduzidos sem adição de ácido oléico e temperatura constante de 37°C .....	208
<b>Figura A4.3 BT3.</b> Evolução da pressão parcial de oxigênio e consumo de substrato em ensaios conduzidos a 30°C até a fase de carência em nitrogênio e 37°C na fase de produção do polímero .....	209
<b>Figura A4.4 BT4.</b> Evolução da pressão parcial de oxigênio e consumo de substrato em ensaios conduzidos com adição de 3,0 g/L de ácido oléico e 30°C até a fase de carência em nitrogênio e 37°C na fase de produção do polímero .....	209
<b>Figura A4.5 BT5.</b> Evolução da pressão parcial de oxigênio e consumo de substrato em ensaios conduzidos com adição de 3,0 g/L de ácido oléico e 30°C até a fase de carência em nitrogênio e adição de 3,0 g/L de ácido oléico e 37°C na fase de produção do polímero .....	210
<b>Figura A4.6. BT6.</b> Evolução da pressão parcial de oxigênio e consumo de substrato em ensaios conduzidos com adição de óleo de canola (equivalente a 3,0 g/L em ácido oléico) e 30°C até a fase de carência em nitrogênio e adição de óleo de canola (equivalente a 3,0 g/L em ácido oléico) e 37°C na fase de produção do polímero .....	210
<b>Anexo 5</b>	
<b>Figura A5.1.</b> Filme de P(3HB) sintetizada sem a presença do ácido graxo (controle) (a) sem degradação e (b) após 21 dias de degradação com a formação de colônias na superfície do filme e a presença de regiões já degradadas (orifícios) .....	213
<b>Figura A5.2</b> Influência do tempo de biodegradação nas propriedades térmicas do P(3HB) sem adição de ácido oléico (controle) a) temperatura de fusão e b) temperatura de transição vítrea .....	214
<b>Figura A5.3.</b> Termograma apresentando os dados obtidos para o percentual de perda de massa no primeiro e segundo estágio de degradação, as temperaturas do início da degradação térmica e a temperatura máxima de degradação para cada estágio. A curva pontilhada representa a derivada (dm/dT) .....	215
<b>Figura A5.4.</b> Espectro de FT-IR para o polímero sintetizado por <i>Ralstonia eutropha</i> contendo 0,3g/L de ácido oléico no meio de cultura.....	215
<b>Figura A5.5.</b> Espectro de FT-IR para o polímero sintetizado por <i>Ralstonia eutropha</i> contendo 0,9g/L de ácido oléico no meio de cultura.....	216
<b>Figura A5.6.</b> Espectro de FT-IR para o polímero sintetizado por <i>Ralstonia eutropha</i> contendo 1,5g/L de ácido oléico no meio de cultura.....	216

# Lista de tabelas

## Capítulo 1

<b>Tabela 1.1</b> Alguns representantes da família dos PHAs .....	28
<b>Tabela 1.2</b> Principais características do P(3HB) e do PP .....	34
<b>Tabela 1.3</b> Propriedades de polímeros e copolímeros PHA com polímeros convencionais .....	35
<b>Tabela 1.4</b> Dados de fermentação utilizados na análise de processo e avaliação econômica .....	44
<b>Tabela 1.5</b> Fatores que influenciam a degradação dos polímeros biodegradáveis .....	65

## Capítulo 2

<b>Tabela 2.1</b> Composição do meio mineral (MM) .....	72
<b>Tabela 2.2</b> Composição da solução de oligoelementos .....	72
<b>Tabela 2.3</b> Resumo das condições de cultivo utilizadas em biorreator.....	75
<b>Tabela 2.4</b> Volumes de água, amostra e reagentes utilizados na dosagem de nitrogênio.....	80

## Capítulo 3

<b>Tabela 3.1</b> Valores de biomassa, produtividade em células e fatores de conversão de substrato em células (para 6h de cultivo) e velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) para os cultivos conduzidos a 30°C e 37°C.	95
<b>Tabela 3.2</b> Produção de P(3HB), produtividade em polímero e fator de conversão de substrato em polímero após 24h de cultivo de <i>Ralstonia eutropha</i> , nas temperaturas de 30 e 37°C, em função de diferentes concentrações de ácido oléico .....	101
<b>Tabela 3.3</b> Concentração de biomassa total, biomassa residual máxima, P(3HB) máximo e substrato (açúcar invertido) consumido, considerando 30h de cultivo e os parâmetros globais de fator de conversão de substrato em biomassa residual e em P(3HB) e produtividade em biomassa residual e em P(3HB)	110
<b>Tabela 3.4</b> Fator de conversão de substrato (açúcar invertido) em biomassa residual, conteúdo em P(3HB) e produtividade em biomassa residual e em P(3HB) para as fases de crescimento e produção de polímero..	111
<b>Tabela 3.5</b> Fatores de conversão de substrato em célula e em polímero para as diferentes estratégias e fases de cultivo (expresso em Cmol/Cmol) .....	112

## Capítulo 4

<b>Tabela 4.1</b> Valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ), entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), obtidos por DSC (2º aquecimento) das amostras de P(3HB) sintetizado por <i>Ralstonia eutropha</i> sem adição de ácido oléico (controle) e obtido industrialmente.....	123
<b>Tabela 4.2.</b> Dados de temperatura de início de degradação ( $T_i$ ) e temperatura máxima de degradação ( $T_{pico}$ ) e percentual de perda de massa obtidos por TGA para os polímeros sintetizados por <i>Ralstonia eutropha</i> sem adição de ácido oléico (controle) e o P(3HB) obtido industrialmente.....	126
<b>Tabela 4.3.</b> Valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ), entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), obtidos por DSC (1º e 2º aquecimento) das amostras de P(3HB) sintetizadas por <i>Ralstonia eutropha</i> com diferentes teores de ácido oléico (AO).....	128
<b>Tabela 4.4.</b> Dados de temperatura de início de degradação ( $T_i$ ) e temperatura máxima de degradação ( $T_{pico}$ ) obtidos por TGA para os polímeros sintetizados por <i>Ralstonia eutropha</i> em função da concentração de ácido oléico (AO).....	131

## Capítulo 5

<b>Tabela 5.1</b> Valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ), entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), obtidos por DSC (1º e 2º aquecimento) das amostras de P(3HB) sem adição de ácido oléico (controle) em função do tempo de degradação.....	139
<b>Tabela 5.2.</b> Valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ), entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), obtidos por DSC (1º e 2º aquecimento) das amostras de P(3HB) contendo 0,3g/L de ácido oléico em função do tempo de degradação .....	141
<b>Tabela 5.3.</b> Valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ), entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), obtidos por DSC (1º e 2º aquecimento) das amostras de P(3HB) contendo 0,9g/L de ácido oléico em função do tempo de degradação .....	142

<b>Tabela 5.4</b> Valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ), entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), obtidos por DSC (1 <sup>o</sup> e 2 <sup>o</sup> aquecimento) das amostras de P(3HB) contendo 1,5g/L de ácido oléico em função do tempo de degradação .....	144
<b>Tabela 5.5</b> Valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ), entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), obtidos por DSC (1 <sup>o</sup> e 2 <sup>o</sup> aquecimento) das amostras de P(3HB) contendo 3,0g/L de ácido oléico em função do tempo de degradação mostrando a $T_g$ (*) .....	144
<b>Tabela 5.6.</b> Dados de temperatura de início de degradação ( $T_i$ ) e temperatura máxima de degradação ( $T_{pico}$ ) e os percentuais de perda de massa obtidos por TGA da amostra de P(3HB) sem adição de ácido oléico (controle) em função do tempo de biodegradação em solo.....	147
<b>Tabela 5.7.</b> Dados de temperatura de início de degradação ( $T_i$ ) e temperatura máxima de degradação ( $T_{pico}$ ) e os percentuais de perda de massa obtidos por TGA da amostra de P(3HB) com adição de 0,9g/L de ácido oléico em função do tempo de biodegradação em solo.....	148
<b>Capítulo 6</b>	
<b>Tabela 6.1.</b> Dados de $T_g$ e $T_m$ para as blendas P(3HB)/PCL no 2 <sup>o</sup> aquecimento .....	155
<b>Tabela 6.2.</b> Dados de TGA para os homopolímeros e as blendas P(3HB)/PCL. Valores de temperatura inicial de perda de massa ( $T_{onset}$ ) e temperatura máxima de perda de massa ( $T_{peak}$ ) para o P(3HB) e PCL, % perda de massa do P(3HB) e PCL .....	158
<b>Anexo 4</b>	
<b>Tabela A4.1.</b> Tempo de duração, substrato (açúcar invertido) consumido, biomassa residual, biomassa total, P(3HB) e velocidade específica máxima de crescimento correspondente à fase de crescimento (identificado pela presença de nitrogênio).....	211
<b>Tabela A4.2.</b> Concentração de substrato (açúcar invertido) consumido, biomassa residual, biomassa total e P(3HB) correspondente à fase de produção (identificado pela exaustão de nitrogênio).....	211
<b>Anexo 5</b>	
<b>Tabela A5.1.</b> Valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ), entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), obtidos por DSC (segundo aquecimento) das amostras de P(3HB) após 7 dias de degradação em função da concentração de ácido oléico mostrando a $T_g$ (*).....	214
<b>Tabela A5.2.</b> Valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ), entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), obtidos por DSC (segundo aquecimento) das amostras de P(3HB) após 14 dias de degradação em função da concentração de ácido oléico mostrando a $T_g$ (*).....	214
<b>Anexo 6</b>	
<b>Tabela A6.1</b> Dados de $T_g$ e $T_m$ para as blendas P(3HB)/PCL no 2 <sup>o</sup> aquecimento após 7 dias de biodegradação .....	218
<b>Tabela A.6.2</b> Dados de $T_g$ e $T_m$ para as blendas P(3HB)/PCL no 2 <sup>o</sup> aquecimento após 14 dias de biodegradação.....	218
<b>Tabela A.6.3.</b> Dados de $T_g$ e $T_m$ para as blendas P(3HB)/PCL no 2 <sup>o</sup> aquecimento após 21 dias de biodegradação .....	218
<b>Tabela A.6.4.</b> Dados de $T_m$ e $\Delta H_m$ para as blendas P(3HB)/PCL no 2 <sup>o</sup> aquecimento após 34 dias de biodegradação .....	219
<b>Tabela A.6.5.</b> Dados de TGA para os homopolímeros e as blendas P(3HB)/PCL no tempo zero (sem biodegradação) . Valores de temperatura inicial de perda de massa ( $T_i$ ) e temperatura máxima de perda de massa ( $T_{pico}$ ) para o P(3HB) e PCL, % perda de massa do P(3HB) e PCL .....	219
<b>Tabela A.6.6.</b> Dados de TGA para os homopolímeros e as blendas P(3HB)/PCL após 7 dias de biodegradação. Valores de temperatura inicial de perda de massa ( $T_i$ ) e temperatura máxima de perda de massa ( $T_{pico}$ ) para o P(3HB) e PCL, % perda de massa do P(3HB) e PCL .....	219
<b>Tabela A.6.7.</b> Dados de TGA para os homopolímeros e as blendas P(3HB)/PCL após 14 dias de biodegradação. Valores de temperatura inicial de perda de massa ( $T_i$ ) e temperatura máxima de perda de massa ( $T_{pico}$ ) para o P(3HB) e PCL, % perda de massa do P(3HB) e PCL .....	220

<b>Tabela A.6.8.</b> Dados de TGA para os homopolímeros e as blendas P(3HB)/PCL após 21 dias de biodegradação. Valores de temperatura inicial de degradação ( $T_i$ ) e temperatura máxima de degradação ( $T_{pico}$ ) para o P(3HB) e PCL, % perda de massa do P(3HB) e PCL .....	220
<b>Tabela A.6.9.</b> Dados de TGA para os homopolímeros e as blendas P(3HB)/PCL após 34 dias de biodegradação. Valores de temperatura inicial de degradação ( $T_i$ ) e temperatura máxima de degradação ( $T_{pico}$ ) para o P(3HB) e PCL, % perda de massa do P(3HB) e PCL .....	220
<b>Tabela A.6.10.</b> Dados de TGA para os homopolímeros e as blendas P(3HB)/PCL após 62 dias de biodegradação. Valores de temperatura inicial de degradação ( $T_i$ ), temperatura máxima de degradação ( $T_{pico}$ ) para o P(3HB) e PCL, % perda de massa do P(3HB) e PCL.....	221

## Nomenclatura

Abs – absorvância

AO – ácido oléico

DSC – calorimetria diferencial exploratória

FT-IR – espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

3HV – 3-hidroxicvalerato

3HA – 3-hidroxiclcanoato

(3HB) – 3-hidroxicbutirato

(4HB) – 4-hidroxicbutirato

LCL – alcenoatos de cadeia longa

Mw – massa molar ponderal média

MM – meio mineral

MCL – alcenoatos de cadeia média

PHAs – polihidroxiclcanoatos

P(3HB) – poli(3-hidroxicbutirato)

PCL – poli( $\epsilon$ -caprolactona)

PLA – polilactídeo

P(3HB-co-3HV) – poli(3-hidroxicbutirato-co-3-hidroxicvalerato)

PVC – poli(cloreto de vinila)

PE – polietileno

PP – polipropileno

$P_{P(3HB)}$  – produtividade em polímero ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )

$P_{Xr}$  – produtividade em célula ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )

SCL – alcenoatos de cadeia curta

SEM - microscopia eletrônica de varredura

$T_c$  – temperatura de cristalização ( $^{\circ}\text{C}$ )

$T_g$  – temperatura de transição vítrea ( $^{\circ}\text{C}$ )

$T_m$  – temperatura de fusão ( $^{\circ}\text{C}$ )

TGA – análise termogravimétrica

$T_{\text{inicial}}$  ou  $T_i$  – temperaturas de início da degradação ( $^{\circ}\text{C}$ )

$T_{\text{máx}}$  ou pico – temperatura máxima de degradação ( $^{\circ}\text{C}$ )

UV – ultravioleta

$X_r$  – biomassa residual (g/L)

$X_t$  – biomassa total (g/L)

$Y_{P(3HB/S)}$  – fator de conversão de substrato em polímero

$Y_{Xr/S}$  – fator de conversão de substrato em célula

$\mu_{Xr}$  – velocidade específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ )

$\Delta H_m$  – entalpia de fusão (J/g)

$\alpha_c$  – grau de cristalinidade (%)

## Resumo

Os polímeros biodegradáveis possuem propriedades similares aos plásticos convencionais e têm a vantagem de serem degradados no solo em poucos meses pela ação de microrganismos. O poli(3-hidroxi-butirato) – P(3HB) é um poliéster produzido e acumulado como reserva de energia por inúmeras bactérias, na forma de grânulos localizados no interior das células. A proposta deste trabalho foi sintetizar P(3HB) com o cultivo da bactéria *Ralstonia eutropha* na presença de diferentes concentrações de ácido oléico (AO), em diferentes temperaturas, avaliando seu efeito sobre o crescimento celular e a síntese do polímero. Os resultados demonstraram que o acréscimo de ácido oléico contribuiu para o aumento da velocidade específica de crescimento e a produtividade em células em condições balanceadas a 30°C, em frascos agitados. Em biorreator, a adição de ácido oléico proporcionou a maior produtividade e conversão de substrato em polímero. Com a adição de 3,0g/L de ácido oléico ou equivalente em óleo de canola, o aumento da quantidade de P(3HB) produzido chegou a 100% quando adicionado nas duas fases. O aumento crescente de ácido oléico levou à formação de polímeros menos cristalinos, com redução no grau de cristalinidade de 70,4% (0g/L de AO) para 52,5% (3,0g/L de AO). Uma redução de 11°C na temperatura de fusão ( $T_m$ ) em relação à amostra controle foi observada para o polímero sintetizado com 3,0 g/L de AO. A temperatura de início de degradação ( $T_i$ ) variou entre 280-283,9°C para as concentrações de 0 a 1,5g/L de AO. Com a adição de 3,0g/L de AO a  $T_i$  caiu para 270°C. Para avaliar a biodegradação, os filmes preparados por evaporação de solvente, em várias composições, foram enterrados no fundo de copos de Becker contendo solo envelhecido. As amostras permaneceram enterradas por 0, 7, 14 e 21 dias. A análise visual para taxa de biodegradação foi: 3,0g/L de AO > 1,5g/L de AO > 0,9g/L de AO ~ 0,3g/L de AO > 0g/L de AO. Com 0,9 e 3,0g/L de AO após 7 dias de degradação em solo houve uma diminuição acentuada na entalpia de fusão e no grau de cristalinidade. Em decorrência das propriedades físicas inferiores do P(3HB), a última parte do presente trabalho teve como objetivo preparar blendas de P(3HB)/PCL e estudar a biodegradação dessas misturas em solo. A poli(ε-caprolactona) (PCL) age como plastificante polimérico, melhorando a processabilidade da blenda. Foi possível concluir que as blendas com alto teor de P(3HB) degradam mais rápido do que o P(3HB) puro. Os resultados das análises de calorimetria exploratório diferencial (DSC) indicaram um aumento do grau de cristalinidade e aumento da temperatura de fusão, o que sugere que a degradação se inicia na parte amorfa e que está ocorrendo simultaneamente um processo de recristalização, formando cristais mais perfeitos, que se fundem a uma temperatura superior. As análises termogravimétricas evidenciaram uma diminuição da estabilidade térmica tanto para o P(3HB) como para as blendas, independentemente da sua composição, ao longo do tempo de degradação. De uma forma geral, os resultados mostram uma mudança drástica na cinética de biodegradação em solo das blendas a partir de 50% de P(3HB) na blenda.

**Palavras-chave:** Síntese; caracterização; biodegradação; poli-(3-hidroxi-butirato); blendas P(3HB)/PCL

## ABSTRACT

The environmental impact caused by the disposal of plastics has motivated the development of biodegradable and biocompatible materials. Polyhydroxyalkanoates have been attracting much attention in recent years as biodegradable and biocompatible thermoplastics with potential applications ranging from agricultural implements to biomedical applications. One example of this kind of material is poly(3-hydroxybutyrate), P(3HB) a bacterial storage compound that are synthesized and deposited intracellularly in the form of inclusion bodies (“granules”) and might amount up to 90% of the cellular dry weight. The results showed that supplementation with oleic acid of cultures producing P(3HB) increased the growth rate and the cell productivity in balanced condition at 30°C in shake flasks. In bioreactor, the addition of oleic acid gave the best productivity and polymer yield ( $Y_{pol/S}$ ). With 3,0 g/L of oleic acid or equivalent in canole oil, the polymer production was 100% increased, if added in both phases. The crystallinity was reduced from c.a 70% (0 g/L of oleic acid) to c.a 52% (3,0 g/L of oleic acid). A reduction of 11°C in melting temperature ( $T_m$ ) was observed for the polymer synthesized with 3,0 g/L of oleic acid. The onset temperature ( $T_i$ ) of degradation varied between 280-284°C for 0 to 1,5 g/L of oleic acid. With 3,0 g/L of oleic acid, the  $T_i$  decreased to 270°C. To evaluate the biodegradation, the films prepared by casting, in various compositions, were buried in Beckers with soil for 0, 7, 14 and 21 days. The visual analysis for biodegradation was: 3,0 g/L of oleic acid > 1,5 g/L of oleic acid > 0,9 g/L of oleic acid ~ 0,3 g/L of oleic acid > 0 g/L of oleic acid. With 0,9 and 0,3 g/L of oleic acid, after 7 days of degradation in soil, the melting enthalpy and the crystallinity degree were diminished. Considering the low properties of P(3HB), the last part of this work aimed to prepare P(3HB)/PCL blend and to study their biodegradability. PCL acts as plasticizer, improving the blend characteristics. It was possible to conclude that blends with high content of P(3HB) was degraded faster than the homopolymer P(3HB). The results of DSC showed an increase in the crystallinity degree, which suggests that the degradation starts in the amorphous phase and it is occurring a recrystallization process, simultaneously, with crystals more perfects with higher  $T_m$ . The TGA analyses showed that thermal stability decreased for P(3HB) and for blends, despite their composition, as long as the biodegradation proceeded. In general, the results presented a radical change in biodegradation kinetics in soil for blends over 50% of P(3HB) in their composition.

**Keywords:** Synthesis; characterization; biodegradation; poly-3-hydroxybutyrate; blends P(3HB)/PCL

# Sumário

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	vi
<b>LISTA DE TABELAS</b>	x
<b>NOMENCLATURA</b>	xiii
<b>RESUMO</b>	xiv
<b>ABSTRACT</b>	xv
<b>INTRODUÇÃO</b>	19
<b>CAPÍTULO 1 – REVISÃO DA LITERATURA</b>	
1.1 Os polímeros e o impacto causado ao ambiente .....	23
1.2 Polihidroxialcanoatos .....	26
1.2.1 Histórico .....	26
1.2.2 Poli(3-hidroxi- <i>butirato</i> ) .....	31
1.2.2.1 Propriedades do poli(3-hidroxi- <i>butirato</i> ) – P(3HB) .....	32
1.2.3 Poli(3-hidroxi- <i>butirato-co-3-hidroxi-<i>valerato</i></i> ) – P(3HB- <i>co</i> -HV) .....	36
1.3 Blendas poliméricas .....	36
1.3.1 Blendas de polímeros biodegradáveis .....	38
1.4 Outros polímeros biodegradáveis .....	39
1.4.1 Poli( $\epsilon$ -caprolactona) – PCL .....	41
1.5 Microrganismos responsáveis pela produção de PHAs .....	43
1.5.1 <i>Ralstonia eutropha</i> (atualmente <i>Cupriavidus necator</i> ) .....	45
1.5.2 <i>Alcaligenes latus</i> .....	47
1.5.3 <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	47
1.5.4 Organismos metilotróficos .....	48
1.5.5 <i>Pseudomonas</i> ssp .....	48
1.5.6 <i>Escherichia coli</i> .....	49
1.5.7 Culturas mistas .....	50
1.5.8 Plantas transgênicas .....	51
1.6 Biossíntese e regulação da síntese de polihidroxialcanoatos (PHAs) .....	52
1.7 Estratégias e condições de cultivo visando à produção de P(3HB) .....	55
1.8 Vantagens e aplicações dos PHAs .....	59
1.9 Degradação de polímeros .....	61
1.9.1 Biodegradação .....	62
<b>CAPÍTULO 2 – MATERIAL E MÉTODOS</b>	
2.1 Microrganismo .....	71
2.1.1 Meios de cultivo .....	71
2.2 Condições de cultivo .....	73
2.2.1 Culturas iniciais .....	73
2.2.2 Ensaio realizado em frascos agitados .....	73
2.2.3 Ensaio realizado em biorreator .....	74
2.2.3.1 Estratégia de alimentação .....	75
2.3 Técnicas analíticas para acompanhamento do cultivo .....	76
2.3.1 Processamento das amostras .....	76
2.3.1.1 Ensaio em frascos agitados .....	76
2.3.1.2 Ensaio em biorreator .....	77
2.3.2 Biomassa .....	77
2.3.3 Determinação da concentração de P(3HB) (metanólise) .....	78
2.3.4 Determinação da concentração de substrato .....	79
2.3.5 Determinação do teor de nitrogênio .....	80
2.3.6 Determinação do teor de proteína .....	81
2.4 Metodologia utilizada nos cálculos .....	81

2.4.1 Fatores de conversão .....	81
2.4.2 Produtividade .....	82
2.4.3 Velocidades específicas de crescimento celular, formação de produto e consumo de substrato .....	83
2.5 Recuperação do P(3HB) produzido .....	83
2.5.1 Extração de P(3HB) .....	83
2.5.2 Purificação (Recristalização) .....	84
2.6. Caracterização do P(3HB) sintetizado por <i>Ralstonia eutropha</i> .....	85
2.6.1 Calorimetria diferencial exploratória (DSC) .....	85
2.6.2 Análise termogravimétrica (TGA) .....	86
2.6.3 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier .....	86
2.6.4. Difractometria de raio-X .....	87
2.7 Ensaio de biodegradação .....	87
2.7.1 Preparação do solo .....	87
2.7.2 Ensaio de biodegradação .....	88
2.8 Estudo das blendas poliméricas P(3HB)/PCL .....	88
2.8.1 Polímeros utilizados.....	88
2.8.2 Preparação dos homopolímeros e das blendas por evaporação lenta de solvente .....	88
2.8.3 Técnicas analíticas para caracterização dos homopolímeros e das blendas poliméricas (estudo da miscibilidade das blendas) .....	89
2.8.4. Ensaio de biodegradação .....	89
2.8.4.1 Microscopia eletrônica de varredura (SEM) .....	90

### **CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO - SÍNTESE DE P(3HB) POR *Ralstonia eutropha* COM USO DE ÁCIDO OLÉICO COMO SUPLEMENTO NUTRICIONAL**

Uso de ácido oléico como suplemento em culturas para crescimento e/ou produção de P(3HB) e temperaturas de 30°C e 37°C .....	92
3.1 Ensaio preliminares em frascos agitados .....	93
3.1.1 Efeito da suplementação na fase de crescimento celular .....	93
3.1.2 Efeito da suplementação na fase de produção do polímero .....	99
3.2 Ensaio realizados em biorreator .....	103
3.2.1. Características gerais .....	104
3.2.2. Efeito da temperatura de cultivo e da mudança de temperatura de 30°C para 37°C na fase de produção .....	109
3.2.3. Efeito da adição de ácido oléico como suplemento nutricional na fase de crescimento e produção do polímero .....	113

### **CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO - CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE P(3HB) OBTIDOS POR *Ralstonia eutropha* COM O USO DE ÁCIDO OLÉICO COMO SUPLEMENTO NUTRICIONAL**

4.1 Comparação do polímero obtido a partir do cultivo de <i>Ralstonia eutropha</i> com o polímero industrial .....	119
4.1.1 Espectrometria na região do infravermelho com transformada de Fourier .....	119
4.1.2 Difração de raio-X .....	121
4.1.3 Calorimetria diferencial exploratória (DSC) .....	121
4.1.4 Análise termogravimétrica (TGA) .....	125
4.2 Caracterização do P(3HB) sintetizado em diferentes concentrações de ácido oléico .....	127
4.2.1 Calorimetria diferencial exploratória (DSC) .....	127
4.2.2 Análise termogravimétrica (TGA) .....	130

## **CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO – BIODEGRADAÇÃO EM SOLO DOS FILMES DE P(3HB) OBTIDO POR *Ralstonia eutropha* COM O USO DE ÁCIDO OLÉICO COMO SUPLEMENTO NUTRICIONAL**

5.1 Caracterização dos polímeros de P(3HB) após biodegradação em solo .....	133
5.1.1 Análise visual .....	133
5.1.2 Análise da biodegradação em função do tempo de degradação para uma mesma concentração de ácido graxo .....	138
5.1.2.1 Calorimetria diferencial exploratória .....	138
5.1.3 Análise da biodegradação em função da concentração de ácido oléico para um mesmo tempo de degradação .....	145
5.1.3.1 Calorimetria diferencial exploratória .....	145
5.1.3.2 Análise termogravimétrica .....	147
5.1.3.3 Espectrofotometria na região do infravermelho .....	150

## **CAPÍTULO 6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO - CARACTERIZAÇÃO E BIODEGRADAÇÃO DAS BLENDEAS DE P(3HB)/PCL**

6.1 Miscibilidade das blendas .....	153
6.1.1 Calorimetria diferencial exploratória (DSC).....	153
6.1.2 Análise termogravimétrica (TGA) .....	156
6.1.3 Microscopia eletrônica de varredura (SEM) .....	158
6.2 Biodegradação das blendas .....	164
6.2.1 Análise visual .....	164
6.2.3 Calorimetria diferencial exploratória (DSC).....	166
6.2.3 Análise termogravimétrica (TGA) .....	172
6.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (SEM) .....	177
6.2.4.1 Blendas após 7 dias de biodegradação em solo .....	177
6.2.4.2 Blendas após 14 dias de biodegradação em solo .....	178
6.2.4.3 Blendas após 34 dias de degradação em solo .....	179
CONCLUSÕES .....	182
SUGESTÕES E PERSPECTIVAS .....	184
REFERÊNCIAS .....	185
ANEXO 1 Curvas de Correlação.....	196
ANEXO 2 Cultivo de <i>Ralstonia eutropha</i> para ensaios conduzidos em frascos agitados com adição de ácido oléico sobre o crescimento celular nas temperaturas de 30°C e 37°C .....	198
ANEXO 3 Cultivo de <i>Ralstonia eutropha</i> para ensaios conduzidos em frascos agitados com adição de ácido oléico sobre a fase de produção do polímero nas temperaturas de 30°C e 37°C .....	202
ANEXO 4 Cultivo de <i>Ralstonia eutropha</i> para ensaios conduzidos em biorreator em diferentes estratégias de adição de ácido temperatura de processo.....	207
ANEXO 5 Dados obtidos dos termogramas de DSC e TGA.....	212
ANEXO 6 Tabelas referentes aos dados obtidos dos termogramas de DSC e TGA..	217

## INTRODUÇÃO

O uso de materiais poliméricos vem crescendo na sociedade. Um grande número de aplicações fortemente relacionadas à morfologia e às características mecânicas e térmicas desses materiais está em contínuo desenvolvimento. No entanto, os plásticos convencionais, tais como o polipropileno (PP), o poliestireno (PS), o polietileno (PE) e o poli(cloreto de vinila) (PVC), apresentam taxas extremamente baixas de degradação, o que pode levar a sérios problemas de desequilíbrio ambiental, como, por exemplo, as quantidades crescentes de resíduos plásticos que se acumulam dia após dia, pondo em risco as relações presentes nos ecossistemas terrestres e aquáticos. Mais especificamente, o acúmulo de resíduos plásticos em aterros sanitários dificulta a circulação e as trocas de gases e líquidos, retardando a estabilização da matéria orgânica.

Dois problemas ambientais relacionados à utilização de materiais poliméricos podem ser destacados: o tempo necessário para que ocorra degradação e a utilização de recursos não-renováveis (petróleo). Dentre as soluções mais utilizadas para minimizar o impacto ambiental, destacam-se métodos combinados de reciclagem, incineração e biodegradação. A reciclagem foi adotada com muito entusiasmo pelos países desenvolvidos. Entretanto, ela sozinha não é suficiente para processar a grande quantidade de plásticos descartáveis e as propriedades finais dos polímeros reciclados, na maioria das vezes, são inferiores às aquelas apresentadas originalmente. A incineração, quando controlada de maneira apropriada, é uma alternativa já praticada em muitos países. No entanto, a queima de polímeros pode produzir materiais voláteis, tóxicos, como é o caso do PVC, cuja incineração libera ácido clorídrico.

Uma alternativa de solução desse problema é o uso de polímeros biodegradáveis, que vem despertando interesse de pesquisadores de todas as áreas, devido à diversidade de suas aplicações nos campos da biotecnologia, medicina, farmácia e agricultura.

Os poli(hidroxicanoatos) – PHAs –, poliésteres naturais e biodegradáveis, podem sofrer degradação hidrolítica, química ou enzimática e, sob ação de microrganismos, sofrem redução da massa molar e são degradados completamente, produzindo dióxido de carbono e água. O poli(3-hidroxiбутирато) – P(3HB) – é um exemplo bem conhecido de PHA. É produzido por cultura bacteriana, com predomínio no uso da bactéria *Ralstonia eutropha*. Trata-se de uma síntese que ocorre em duas etapas: na primeira etapa, procura-se favorecer ao máximo o crescimento celular e assegurar, ao mesmo tempo, que a síntese do polímero seja a menor possível; inversamente, na segunda etapa, interrompe-se o crescimento celular e estimula-se ao máximo o acúmulo de polímero nas células.

Mas não é só a biodegradabilidade que torna o P(3HB) interessante. A síntese desse polímero a partir de fontes renováveis de carbono, oriundas da agroindústria, permite um processo cíclico fechado sustentável para sua produção e uso, contrariamente ao emprego de tecnologias de ponta ligadas à produção e uso dos plásticos petroquímicos, que, além de utilizarem fontes esgotáveis de matéria-prima, dão origem a materiais que demoram cerca de 500 anos para serem degradados. Embora apresente muitas vantagens, o processo produtivo de P(3HB) é ainda de custo elevado. Esse fato tem levado vários pesquisadores a estudar diferentes possibilidades de diminuição de custo, tais como alteração genética de microrganismos, novos processos de extração, utilização de substratos de baixo custo e novas estratégias de cultura. Uma dessas estratégias inclui a utilização de suplementos durante a cultura para aumentar a produção do polímero.

O P(3HB) possui propriedades similares ao polipropileno (PP). Entretanto, devido à fragilidade desse polímero, suas aplicações são limitadas. A identificação de unidades HA, além das unidades 3HB, nas moléculas de polihidroxicanoatos de origem microbiana, teve um grande impacto sobre os interesses comerciais em relação a esses organismos. A fim de se obter um material com melhores características, o P(3HB) pode ter outras unidades monoméricas incorporadas na sua estrutura ou pode ser modificado mediante misturas físicas

com outros polímeros que sejam também biodegradáveis (blendas), o que resulta em uma gama maior de aplicações desse polímero. A poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), que também é um plástico biodegradável, pode agir como plastificante polimérico melhorando a processabilidade de blendas, com vistas ao emprego desses filmes em diversos segmentos.

Nesse contexto, este trabalho teve como **objetivos**:

- a) ESTUDAR diferentes concentrações de ácido oléico como indutor da produção de P(3HB), nas fases de crescimento celular e acúmulo de P(3HB), em sistema agitado nas temperaturas de 30°C e 37°C;
- b) AVALIAR a influência das condições de cultura utilizadas para síntese dos polímeros sobre as suas características físico-químicas (DSC, TGA, DRX, FT-IR) e compará-los com o polímero sintetizado pela PHB Industrial;
- c) AVALIAR a biodegradação de filmes de P(3HB) sintetizados com diferentes concentrações de ácido oléico;
- d) VERIFICAR a miscibilidade de filmes de blendas poliméricas de P(3HB)/PCL;
- d) AVALIAR a biodegradação de filmes de blendas poliméricas de P(3HB)/PCL.

*É na experiência da vida que o homem evolui.*

(Harvey Spencer Lewis)

## **Capítulo 1 - REVISÃO DA LITERATURA**

---

Em decorrência dos crescentes problemas ambientais causados pela produção e acúmulo de materiais plásticos de origem petroquímica no ambiente, tem-se estudado a substituição desses materiais por polímeros biodegradáveis. No entanto, seu alto custo de produção em relação aos plásticos petroquímicos tem induzido a realização de inúmeras pesquisas para redução do custo de seu processo de obtenção. O capítulo da revisão fundamenta o tema da tese com base no que já foi desenvolvido sobre o assunto por outros grupos de pesquisa ou pesquisadores individuais.

## 1.1 Os polímeros e o impacto causado ao ambiente

Um dos materiais mais importantes na sociedade atual é o polímero, que, sob diversas formas, tornou-se de uso indispensável. É facilmente moldado em formas complexas, tem alta resistência química e é relativamente elástico. Alguns tipos de polímero até podem ser formados em fibras ou em filmes finos. Essas características tornam os polímeros próprios para aplicação em bens duráveis e em embalagens (MARANGONI, 2000).

Dentre os polímeros de origem petroquímica, os hidrocarbonetos são, sem dúvida, os produtos comerciais de maior consumo em nosso planeta. Entre as décadas de 1960 e 1970 o consumo mundial era de 2,5 bilhões de toneladas por ano e, nos últimos 20 anos, houve um aumento anual de 10% (REDDY *et al.*, 2003).

O Brasil, embora com uma produção anual de plásticos de aproximadamente 2,3 milhões de toneladas, dos quais 40% destinam-se à indústria de embalagens (SANTOS *et al.*, 2001), é o sétimo maior consumidor mundial, com 3,2 milhões de toneladas (2,8% do consumo mundial) ([www.abiplast.com.br](http://www.abiplast.com.br)), equivalendo a cerca de 15kg/hab./ano. Esse número sobe para 70kg/hab./ano em países desenvolvidos como a Alemanha (VASCONCELOS, 2002). Entretanto, a Alemanha pretende substituir nos próximos 60 anos, pelo menos 60% do plástico sintético consumido internamente por polímeros biodegradáveis. A medida visa, entre outras coisas, aliviar os aterros sanitários do país.

Cerca de 40% dos 200 milhões de toneladas de plásticos produzidos a cada ano são descartados em aterros sanitários. Centenas de milhares de toneladas são descartadas anualmente em ambientes marinhos, acumulando-se em regiões oceânicas (REDDY *et al.*, 2003). Assim, por terem longa duração e persistirem na natureza, os polímeros têm sido alvo de preocupação dos ambientalistas do Brasil e do mundo.

Somente na cidade de Joinville, recolhem-se mensalmente 9.000 toneladas de lixo e essa produção cresce 5 a 6% ao ano. A quantidade de lixo plástico é estimada entre 25% a

30% desse valor ([www.joinville.sc.gov.br](http://www.joinville.sc.gov.br)). A vida útil dos aterros sanitários fica comprometida, pois o longo tempo de permanência dos polímeros sintéticos nesses locais provoca graves problemas ambientais, porque eles formam uma camada impermeabilizante que impede a passagem de líquidos e gases originados da metabolização da matéria orgânica, retardando a sua estabilização (VASCONCELOS, 2002).

Reciclagem e incineração são métodos utilizados para a solução desse problema, tendo a reciclagem sido adotada com sucesso pelos países desenvolvidos. Entretanto, ela sozinha não é suficiente para processar a grande quantidade de polímeros descartáveis, e as propriedades finais dos polímeros reciclados são inferiores (MARANGONI, 2000).

A incineração, quando controlada de maneira apropriada, é uma alternativa já praticada em muitos países. No entanto, provoca uma poluição ambiental secundária, devido à produção de gases venenosos (KIM *et al.*, 2000). Embora a queima de poliolefinas não halogenadas – como polietilenos, polipropilenos e poliestirenos – libere principalmente dióxido de carbono na atmosfera em quantidades negligenciáveis quando comparadas aos combustíveis fósseis (BRAUNEGG *et al.*, 1998), outros polímeros podem produzir materiais voláteis e tóxicos, como é o caso do PVC, cuja incineração libera ácido clorídrico (KRUPP e JEWELL, 1992).

Em resposta à preocupação pública crescente com os efeitos maléficos dos materiais poliméricos de origem petroquímica no meio ambiente, muitos países têm conduzido programas de gerenciamento dos resíduos sólidos, incluindo a redução de resíduos poliméricos e o desenvolvimento de materiais poliméricos biodegradáveis (LEE, 1996a).

Existem três tipos de polímeros biodegradáveis: os fotodegradáveis, os semidegradáveis e os completamente biodegradáveis. Polímeros fotodegradáveis têm grupos sensíveis à luz incorporados diretamente na cadeia principal do polímero. A radiação ultravioleta (de semanas a meses) pode desintegrar a estrutura polimérica, facilitando o acesso microbiano. No entanto, aterros sanitários carecem de luz solar, e tais polímeros permanecem, assim, não degradados. Polímeros semibiodegradáveis possuem amido incorporado a

fragmentos de polietileno. A idéia por trás dos polímeros “ligados ao amido” é que, uma vez descartados em aterros, as bactérias do solo irão atacar o amido liberando fragmentos do polímero, que pode ser degradado por outras bactérias. As bactérias de fato atacam o amido, no entanto não são capazes de consumir os fragmentos de polietileno, que permanecem não degradáveis. O terceiro tipo de plástico biodegradável é relativamente recente e promissor, dada a sua real utilização pelas bactérias. Nesse grupo se incluem os polihidroxicanoatos (PHA), polilactídeos (PLA), poliésteres alifáticos, polissacarídeos e seus copolímeros e/ou blends (REDDY *et al.*, 2003).

Dentre os polímeros biodegradáveis, destacam-se os polihidroxicanoatos (PHAs), que, por possuírem propriedades semelhantes aos materiais termoplásticos e serem biodegradáveis, biocompatíveis e passíveis de serem produzidos a partir de matérias-primas renováveis (GOMES e BUENO NETTO, 1997), oferecem a possibilidade de um ciclo fechado, que minimiza o impacto ambiental.

Dentre os PHAs, um poliéster que vem se destacando é o poli(3-hidroxiбутирато) – P(3HB) (YAMANE *et al.*, 1996), cujas propriedades, semelhantes às do polipropileno, têm permitido seu largo uso nas áreas ambiental e agrícola. Os copolímeros podem ser formados com a co-alimentação de substratos, que pode resultar na formação de polímeros contendo unidades de 3-hidroxiуalerato (3HV) ou 4-hidroxiбутирато (4HB) (REDDY *et al.*, 2003).

## 1.2 Polihidroxicanoatos

### 1.2.1 Histórico

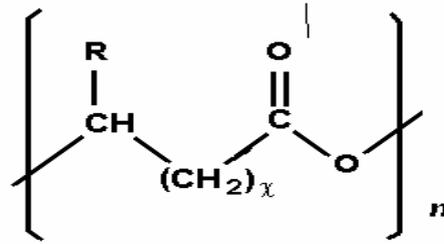
Os polihidroxicanoatos (PHAs) são uma família de poliésteres biológicos opticamente ativos que contêm unidades monoméricas de (R)-3HA. Eles têm recebido considerável atenção devido a seu uso potencial como termoplásticos ambientalmente amigáveis (DOI *et al.*, 1990). Os PHAs constituem uma classe geral de polímeros produzidos e acumulados como reserva de carbono e energia por

inúmeros microrganismos (JENDROSSEK *et al.*, 1996; SUDESH *et al.*, 2000). Na figura 1.1, pode-se observar que os carboidratos sintetizados pelas plantas na forma de açúcares simples podem fornecer a matéria-prima necessária para a produção de PHA. Um organismo específico, que ocorre largamente na natureza, é utilizado num processo fermentativo para converter carboidratos em PHAs. O polímero extraído é convertido em produtos plásticos. Embora os PHAs sejam estáveis no uso normal, quando depositados no meio ambiente são metabolizados por microrganismos. A biodegradação, sob condições aeróbias, produz  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (JENDROSSEK *et al.*, 1996), que absorvidos pelas plantas por meio da fotossíntese são convertidos em carboidratos, fechando assim o ciclo.



**Figura 1.1** Ciclo fechado de produção de polihidroxialcanoato (PHA). Fonte: Metabolix, 2004

A maioria dos PHAs são poliésteres alifáticos formados por carbono, oxigênio e hidrogênio, cuja fórmula estrutural está representada na figura 1.2 (GOMES e BUENO NETTO, 1997; REDDY *et al.*, 2003). A composição da cadeia lateral (R) e o valor de X determinam a identidade da unidade monomérica. Mais de 100 diferentes unidades monoméricas já foram identificadas como constituintes dos PHAs em várias bactérias; algumas delas podem ser observadas na tabela 1.1 (LEE, 1996a).



**Figura 1.2** Fórmula química estrutural da maioria dos polihidroxialcanoatos (PHAs) produzidos por bactérias. PHAs são comumente compostos por (R)- $\beta$ -hidroxiácidos graxos, onde o grupo R varia de acordo com a tabela 1.1 (GOMES e BUENO NETTO, 1997; REDDY *et al.*, 2003)

A composição monomérica dos PHAs depende da bactéria produtora e também da fonte de carbono utilizada durante a fase de acumulação. De acordo com o número de átomos de carbono, os PHAs são classificados em polímeros de cadeia curta (3–5 átomos de carbono, PHA<sub>SCL</sub>), polímeros de cadeia média (6–15 átomos de carbono, PHA<sub>MCL</sub>) (TSUGE, 2002) e polímeros de cadeia longa (mais de 15 átomos de carbono, PHA<sub>LCL</sub>) (JENDROSSEK *et al.*, 1996). Os PHA<sub>MCL</sub> possuem um grau de cristalinidade menor se comparados ao P(3HB) ou P(3HB-*co*-3HV), sendo mais elásticos. Em decorrência dessa propriedade, sua aplicabilidade é aumentada.

A maioria dos organismos sintetiza PHA<sub>SCL</sub> contendo unidades de 3HB (SUZUKI *et al.*, 1988; PREUSTING *et al.*, 1990; KIM *et al.*, 2000) ou PHA<sub>MCL</sub> contendo unidades de 3-hidroxialcanoato (3HO) e 3-hidroxidodecanoato (3HD) como principais monômeros (RAMSAY *et al.*, 1990, STEINBÜCHEL e DOI, 2002, LEE 1996a, REDDY *et al.*, 2003). A produção de PHA ocorre sobre uma ampla variedade de substratos, tais como fontes renováveis (sacarose, amido, celulose, triacilglicerol), fontes fósseis (metano, óleo mineral), resíduos agroindustriais (melaço, soro de queijo, glicerol), químicos (ácido propiônico, ácido 4-hidroxibutírico) e dióxido de carbono (REDDY *et al.*, 2003).

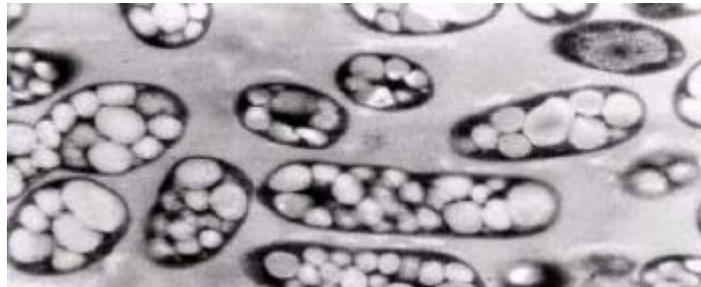
Os PHAs são armazenados na forma de grânulos (medindo 0,2 – 0,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro) no interior de bactérias gram-positivas e gram-negativas, podendo chegar a até 80% da massa seca da célula, como pode ser observado na figura 1.3. A observação em microscópio desses

grânulos em células bacterianas (*Bacillus megaterium*) foi feita pela primeira vez por Beijerinck, em 1888 (BRAUNEGG *et al.*,1998; REDDY *et al.*, 2003).

**Tabela 1.1** Alguns representantes da família dos PHAs

N=1	R = hidrogênio R= metil R= etil R = propil R = pentil R= nonil	Poli(3-hidroxiopropionato) Poli(3-hidroxi butirato) Poli(3-hidroxi valerato) Poli(3-hidroxi hexanoato) Poli(3-hidroxi octanoato) Poli(3-hidroxi dodecanoato)
N=2	R = hidrogênio R= metil	Poli(4-hidroxi butirato) Poli(4-hidroxi valerato)
N=3	R = hidrogênio R= metil	Poli(5-hidroxi valerato) Poli(5-hidroxi hexanoato)
N=4	R = hexil	Poli(6-hidroxi dodecanoato)

Fonte: LEE (1996a)



**Figura 1.3** Grânulos do polímero biodegradável P(3HB) no interior das bactérias (BRAUNEGG *et al.*,1998)

Os grânulos são envoltos por uma camada fosfolipídica, por polimerases, despolimerases e proteínas citosólicas não específicas. A função da monocamada fosfolipídica ainda não está bem estabelecida, embora se suponha que ela seja necessária para evitar o contato dos polihidroxi alcenoatos com a água, evitando assim a transição do poliéster do estado amorfo para o estado mais estável – forma cristalina. Supõe-se ainda que ela aja como uma barreira protetora evitando danos celulares causados pela interação de PHAs com estruturas internas ou com proteínas citosólicas (LUENGO *et al.*, 2003).

A primeira determinação da composição de um PHA foi realizada por Lemoigne – microbiologista do Instituto Pasteur, em Paris – somente em 1927 (DOI *et al.*, 1990). Em um bacilo de solo semelhante ao *Bacillus megaterium*, a degradação anaeróbia desse material desconhecido levou à excreção do ácido 3-hidroxi-butírico. Lemoigne identificou esse poliéster como polímero de 3-hidroxi-butirato ou poli(3-hidroxi-butirato) (BRAUNEGG *et al.*, 1998).

Em 1958, Macrae e Wildinson (*apud* BRAUNEGG, 1988), observaram que o *Bacillus megaterium* estocava o homopolímero especialmente quando a razão glicose–nitrogênio no meio era elevada. Eles também observaram que esse material era degradado rapidamente na ausência de fontes externas de carbono e energia. Dessa forma, eles concluíram que o P(3HB) era uma fonte de carbono e energia.

Durante os 30 anos subseqüentes, o interesse no P(3HB) ficou restrito somente à pesquisa de métodos de estimativa do seu conteúdo nas células e sobre as condições de cultivo que permitiam a síntese e degradação do polímero dentro das células do bacilo.

Somente a partir da década de 1970, uma companhia inglesa, a Imperial Chemical Industries (ICI), iniciou pesquisas e depositou patentes para a produção de PHA mediante diversos processos (ASRAR e GRUYS, 2001). Essa mesma indústria criou um copolímero poli(3-hidroxi-butirato)-*co*-(3-hidroxi-valerato) – P(3HB-*co*-3HV), que era sintetizado por *Alcaligenes eutrophus* (denominada *Ralstonia eutropha* e atualmente *Cupriavidus necator*), a partir de glicose e ácido propiônico. Desde então, uma variedade de copolímeros tem sido produzida por *Ralstonia eutropha* e outros microrganismos com o uso de várias fontes de carbono (LEE e CHANG, 1995). Segundo Steinbüchel e Valentim (1995), nas últimas décadas, outros 90 ácidos hidroxialcanóicos foram identificados, tendo-se verificado que uma grande variedade de microrganismos apresenta a capacidade de acumular poli(hidroxialcanoatos).

Em 1990, a ICI transferiu a divisão de fármacos e agricultura para a ZENECA Ltda, incluindo o Biopol® (marca registrada do P(3HB-co-HV)). Em 1996, a MONSANTO adquiriu o direito de comercialização do Biopol®. A partir desta aquisição, a MONSANTO envidou esforços na produção de Biopol e outros polímeros correlatos a partir de plantas e procurou melhorar as propriedades para diferentes usos. Em 1998, a MONSANTO interrompeu a produção e as pesquisas do Biopol, quando em 2001, uma companhia americana – METABOLIX Inc. – adquiriu os direitos do Biopol e vem desenvolvendo pesquisas com transgênicos para manufatura em larga escala de PHAs por meio de processos fermentativos e agricultura biotecnológica (WILLIANS e MARTIN, 2001; [www.metabolix.com](http://www.metabolix.com)).

No Brasil, o desenvolvimento de tecnologia para obtenção do polímero biodegradável começou em 1991, por meio de um acordo de cooperação entre o Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) de São Paulo, a Cooperativa dos Produtores de Cana, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo (Copersucar) e o Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Em 1996, começou a funcionar a fábrica piloto, em Serrana, atualmente PHB Industrial. Em 1997, a Copersucar estabeleceu parceria com diversos processadores de plásticos e instituições de pesquisa e desenvolvimento, no Brasil e no exterior, com o propósito de desenvolver aplicações comerciais do P(3HB) e viabilizar sua produção comercial em larga escala. Além disso, a planta piloto, com capacidade para 60 toneladas/ano (a meta é ampliar para 4 mil toneladas anuais a partir de 2008), está integrada a uma usina de açúcar e álcool. A integração com a usina permite não apenas a redução nos custos de produção, mas também fornece um auto-suprimento de energia, o gerenciamento dos resíduos e outros meios de integração (AKIYAMA *et al.*, 2003). Mesmo com a redução dos custos, os plásticos biodegradáveis ainda são mais caros do que os convencionais. Um quilograma do polímero *commodities* custa cerca de US\$ 1,00, enquanto o do P(3HB) está na faixa de US\$ 4,00 a US\$ 5,00, dependendo de sua aplicação. Apesar dessa diferença de preço, ele é

considerado competitivo, principalmente no mercado externo. Nos Estados Unidos, no Japão e em países europeus, por exemplo, a reciclagem e a comprovação da sua realização obrigatórias, pela indústria fabricante do polímero. Os gastos com essas etapas não estão incluídos no custo do plástico. No Brasil, o cálculo desse custo considera apenas a compra da resina e sua transformação. Não existe preocupação nem com os custos efetivos nem com a reciclagem. Segundo estimativas de vários especialistas, dos 200 milhões de toneladas de polímero produzidos mundialmente, 1% a 2% do mercado deverão corresponder aos bioplásticos nos próximos dez anos ([www.radiobras.gov.br](http://www.radiobras.gov.br)).

### *1.2.2 Poli(3-hidroxi-butirato)*

O poli(3-hidroxi-butirato) — P(3HB) — é um poliéster pertencente à família dos polihidroxi-álcanoatos, natural e biodegradável, que é acumulado na forma amorfa por diferentes bactérias como grânulos intracelulares (inclusões insolúveis em água) (TSUGE, 2002).

A síntese desse polímero acontece quando se limitam nutrientes essenciais, como nitrogênio, potássio, magnésio, ferro etc., com excesso da fonte de carbono. O interesse industrial na produção do P(3HB) iniciou na década de 60, quando suas propriedades termoplásticas foram primeiramente descritas. Durante a década de 70, esse polímero foi considerado como potencial substituto para os polímeros convencionais de origem petroquímica, uma vez que o P(3HB) é produzido por meio de fontes renováveis de carbono (GOMEZ *et al.*, 1997).

#### **1.2.2.1 Propriedades do poli(3-hidroxi-butirato) – P(3HB)**

O P(3HB), como todos os PHAs, é insolúvel em água, ou seja, hidrofóbico, podendo ser degradado por uma variedade de microrganismos (JENDROSSEK *et al.*, 1996). Apresenta as seguintes propriedades: é opticamente ativo (cada monômero possui um carbono quiral em

configuração D(-)); é piezoelétrico (as moléculas do polímero são organizadas em hélices sem centros simétricos); é atóxico, biocompatível, e apresenta alto grau de polimerização (ANDERSON e DAWES, 1990).

As propriedades físicas e mecânicas dos PHA<sub>SCL</sub> e PHA<sub>MCL</sub> são distintas: os PHA<sub>SCL</sub> têm alto grau de cristalinidade, sendo rígidos e quebradiços, enquanto os PHA<sub>MCL</sub> são elastômeros com baixa cristalinidade e baixa temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) (LEE *et al.*, 2000).

As propriedades desejáveis às diferentes aplicações de um material polimérico são: elevado ponto de fusão, baixa rigidez, alta resistência à pressão, resistência ao alongamento antes da ruptura e forte resistência ao impacto. Atualmente, têm sido realizados muitos estudos sobre as propriedades térmicas e físicas dos polímeros bacterianos, principalmente com o P(3HB) e seu copolímero P(3HB-co-3HV) (SUDESH, 2000).

A tabela 1.2 apresenta as principais características dos polímeros P(3HB) e polipropileno (PP). A fusão é uma característica dos polímeros semicristalinos. A temperatura de fusão ( $T_m$ ) de um polímero é aquela em que o polímero funde, adquirindo característica de fluido viscoso, podendo ser processado a temperaturas próximas ou acima desta. Ambos fundem a temperaturas muito próximas, 180°C para o P(3HB) e 174°C para o PP.

Polímeros amorfos não apresentam pico de fusão quando submetidos ao aquecimento em análises DSC<sup>1</sup>, apresentando temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ). A  $T_g$  é aquela temperatura em que os polímeros passam do estado vítreo para o estado borrachoso, adquirindo certo grau de flexibilidade devido à maior movimentação entre as cadeias

---

<sup>1</sup> A calorimetria exploratória diferencial (DSC) mede a absorção ou liberação de calor em função da temperatura em que ocorrem as mudanças físicas ou químicas do polímero. Alterações de temperaturas da amostra são devidas a variações de entalpia endotérmicas ou exotérmicas decorrentes de transições físicas ou de reações químicas. As variações de entalpia são chamadas de transições de primeira ordem, como fusão, cristalização, vaporização, solidificação, adsorção. A transição térmica dita de segunda ordem, conhecida como temperatura de transição vítrea, é acompanhada de variação da capacidade calorífica da amostra, juntamente com variações dimensionais e viscoelásticas, mas não apresentam variações de entalpia. Assim sendo, essas variações não apresentam picos nas curvas de DSC, manifestando-se na forma de alterações na linha de base. O acompanhamento do processo de fusão permite estudar fenômenos relacionados à estrutura e às propriedades dos polímeros, tais como temperatura de fusão, grau de cristalinidade, identificação de misturas, entre outras (SPIER, 2005).

macromoleculares. Nesse ponto se inicia o movimento de segmentos da cadeia polimérica, não sendo uma transição termodinâmica e sim uma transição do tipo relaxação (LUCAS, 2001 *apud* SPIER, 2005).

Essa temperatura é característica para cada polímero. Os valores de  $T_g$  dos dois polímeros indicam que o PP, por possuir  $T_g = -17^\circ\text{C}$ , mostra-se mais flexível que o P(3HB) ( $T_g = 5^\circ\text{C}$ ). A maior flexibilidade do PP em relação ao P(3HB) é confirmada pelo módulo de elasticidade (ou módulo de Young) do PP (1.700MPa), que é bem inferior ao do P(3HB) (3.500MPa) (tabela 1.2).

O módulo de elasticidade de um polímero está diretamente relacionado à sua rigidez ou flexibilidade, de forma que, quanto mais alto o módulo, maior a rigidez do polímero. Os filmes obtidos a partir de P(3HB) apresentam uma excelente impermeabilidade ao oxigênio, o que o torna interessante para uso em embalagens de alimentos (BUCCI *et al.*, 2005). Além disso, o P(3HB) tem uma resistência aos raios UV superior se comparado com o polipropileno (OJUMU, 2004).

O material polimérico se diferencia dos demais materiais por possuir uma cadeia longa, ou seja, de alta massa molar. Cadeias são consideradas poliméricas quando a massa molar é superior a 10.000 unidades de massa atômica (u.m.a). Valores acima de 250.000 u.m.a são considerados de alta massa molar. Durante a polimerização, no entanto, ocorre o crescimento independente da cadeia polimérica, sendo formadas cadeias com diversos tamanhos. Isso produz cadeias poliméricas com comprimentos diferentes, variando em torno de uma média. Assim, não tem sentido falar em massa molar do polímero e sim considerar uma distribuição da massa molar. A polidispersividade dos polímeros é oriunda das variações estatísticas presentes nos processos de polimerização (CANEVAROLO, 2002). As propriedades físico-químicas do polímero são influenciadas de tal modo pela massa molar que o seu conhecimento e controle são de fundamental importância (MANO e MENDES, 2004). Os monômeros (3HB) são polimerizados em moléculas com alta massa molar ponderal média

(Mw) formando o polímero P(3HB) cuja massa molar varia entre  $1 \times 10^4$  e  $3 \times 10^6$  g/mol, conforme o microrganismo e as condições de crescimento (LEE, 1996a).

**Tabela 1.2** Principais características do P(3HB) e do PP

Características	P(3HB)	(PP)
Temperatura de fusão ( $T_m$ )	180°C	174°C
Temperatura de transição vítrea ( $T_g$ )	5°C	-17°C
Módulo de elasticidade (módulo de Young)	3.500MPa	1.700MPa
Densidade	1.18 – 1.25g/cm <sup>3</sup>	0,91g/cm <sup>3</sup>
Permeabilidade de oxigênio	45(cm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> /at/dia)	1.700 (cm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> /at/dia)
Resistência à ruptura	5%	400%
Massa molar média	$1 - 8 \cdot 10^5$	$2,2 - 7 \cdot 10^5$
Grau de cristalinidade	70%	68%

Fonte: Gomez e Bueno Netto, 1997

A cristalinidade de um polímero pode ser considerada como um “arranjo ordenado”, uma repetição regular de estruturas atômicas moleculares. O P(3HB) apresenta todos os seus átomos de carbono ligados assimetricamente, com cristalinidade variando entre 55 e 80% (LEE, 1996b) e, como consequência, é quebradiço ao menor torque. Essa característica é devida, principalmente à presença de um grande domínio cristalino na forma de esferulitos, que, sob condições de resfriamento adequado a partir da fusão, pode reduzir o caráter quebradiço, permitindo a produção de filmes dúcteis. No entanto, ambos os polímeros apresentam alto grau de cristalinidade (MARCHSSAULT e GA-ER YU, 2001).

O grau de cristalinidade e a  $T_m$  podem ser reduzidos por meio da incorporação de outros hidroxialcanoatos dentro da cadeia do P(3HB), como o 3-hidroxicaproato (3HV), para formar o copolímero P(3HB-co-HV) via fermentação (ORTS *et al.*, 1991). Bloembergen *et al.* (1986) observaram um decréscimo do grau de cristalização com aumento da quantidade de 3HV. A variação do conteúdo de 3HV permite obter uma grande variedade de propriedades termomecânicas.

O módulo de Young do P(3HB) decresce consideravelmente com o aumento do teor de 3HV, o que indica que a adição de 3HV aumenta de forma significativa a flexibilidade do copolímero (tabela 1.3) (KUNIOKA *et al.*, 1989).

Além dos copolímeros, muitos estudos estão em andamento visando melhorar as propriedades físicas do P(3HB), como obtenção de blendas com outros polímeros biodegradáveis, tais como ésteres celulósicos, poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) (VOGELSANGER *et al.*, 2003) e amido (ABE e DOI, 1999). O propósito das blendas não é somente melhorar as propriedades inferiores do P(3HB), mas também controlar o perfil da biodegradação (KUMAGAI e DOI, 1992b).

**Tabela 1.3** Propriedades de polímeros e copolímeros PHA com polímeros convencionais

Amostra	Temperatura de fusão (°C)	Temperatura de transição vítrea (°C)	Módulo de Young (GPa)	Resistência à tensão (MPa)	Resistência à ruptura (%)
P(3HB)	180	4	3,5	40	5
P(3HB-co-20mol%3HV)	145	- 1	0,8	20	50
P(3HB-co-6mol%3HA)	133	- 8	0,2	17	680
Polipropileno	174	- 17	1,7	38	400
Polietileno de baixa densidade	130	- 30	0,2	10	620

\* unidades de 3HA: 3-hidroxidecanoato (3mol%), 3-hidroxidodecanoato (3mol%), 3-hidroxiocetanoato (< 1mol%), 3-hidroxi-cis-5-dodecanoato (<1mol%)

Fonte: SUDESH, 2000

### 1.2.3 Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) - P(3HB-co-HV)

O copolímero industrial P(3HB-co-HV), que iniciou seu desenvolvimento industrial pela ZENECA Bioproducts (Inglaterra), possui melhores propriedades mecânicas de processabilidade, em relação ao polímero P(3HB), em função do aumento da resistência ao impacto, da maciez e da flexibilidade. Esse copolímero tem sido obtido pela incorporação de unidades de hidroxivalerato na cadeia polimérica. As propriedades físicas e térmicas desses copolímeros são fortemente dependentes da composição de hidroxivalerato, e a temperatura de fusão decresce significativamente com o aumento da fração de HV no copolímero, sem, contudo, afetar a temperatura de degradação, permitindo melhores condições de processabilidade (tabela 1.3) (POIRIER *et al.*, 1995).

A composição do P(3HB-co-3HV) pode variar de 0 a 30mol% de 3HV, o que altera as quantidades de glicose e ácido propiônico fornecidas durante o acúmulo do polímero,

considerando-se que os monômeros de 3-hidroxivalerato são produzidos a partir de ácido propiônico (POIRIER *et al.*, 1995).

As propriedades mecânicas estão também profundamente correlacionadas à massa molar do polímero, sendo esse mais resistente quando a cadeia é mais longa.

Os copolímeros têm sido utilizados na confecção de vários produtos – incluindo filmes, revestimento de papel e madeira, sacos de adubo, embalagens descartáveis de alimentos – e moldados em produtos como garrafas e outros. O copolímero é produzido em larga escala e vendido com o nome fantasia de BIOPOL<sup>IM</sup> (CHOI e LEE, 1997).

### *1.3 Blendas poliméricas*

O termo blendas poliméricas é utilizado pela maioria dos autores para representar a mistura física de dois ou mais polímeros estruturalmente diferentes (MANSON e SPERLING, 1976). A vantagem do emprego de mistura de componentes, em vez de um componente único, é bem conhecida para uma diversidade de produtos em que as misturas podem visar à obtenção de características novas (MANO, 2000). Além da melhoria das propriedades mecânicas e físico-químicas, em alguns casos, a adição de um polímero a outro resulta num material de melhor processabilidade e aparência final (tabela 1.3), o que pode levar ao barateamento de custos.

De um modo bastante abrangente, as misturas poliméricas podem ser distribuídas em dois grupos: os sistemas miscíveis e os sistemas imiscíveis. Quando a mistura de dois polímeros na fase amorfa se apresenta como uma única fase, a blenda é considerada miscível. Nesse caso, os componentes estão intimamente misturados com uma única temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ). A temperatura de transição vítrea é um parâmetro muito importante tecnologicamente, pois determina os limites de aplicação de um material. Se o polímero é aquecido a partir do estado vítreo, ele começa a amolecer nas vizinhanças da temperatura de

transição vítrea ( $T_g$ ), tornando-se borrachoso. Em contrapartida, as blendas imiscíveis apresentam-se em duas fases distintas, cada uma correspondente aos componentes individuais (processo dominado pela separação de fases), com uma  $T_g$  para cada fase, opacidade e propriedades mecânicas insatisfatórias (PAUL e NEWMAN, 1978). Segundo Gassner e Owen (1994), existe um terceiro grupo de blendas, chamadas de parcialmente miscíveis, em que se observam duas  $T_g$ s, porém deslocadas em relação às  $T_g$ s dos polímeros puros. As blendas poliméricas completamente miscíveis não são muito comuns (P(3HB)/polióxido de etileno; P(3HB)/polialcoolvinílico; P(3HB)/polilactídeo). Os termos miscibilidade e compatibilidade são empregados erroneamente como sinônimos. O termo compatibilidade é mais abrangente que o termo miscibilidade, sendo mais adequado para representar blendas com as propriedades finais desejadas. Dessa forma, uma mistura de polímeros pode ser imiscível e ser compatível ao mesmo tempo, ou seja, ela pode apresentar duas fases, duas  $T_g$ s e possuir as propriedades finais adequadas ou desejadas para a aplicação em questão (HAGE, 1989; PEZZIN, 2001).

### *1.3.1 Blendas de polímeros biodegradáveis*

É possível obter polímeros termoplásticos biodegradáveis, com propriedades mecânicas superiores e a custos reduzidos, com a preparação de blendas de P(3HB) com outro polímero adequado. Embora o P(3HB) cristalize muito lentamente quando resfriado a partir da fusão, formando um material quebradiço, com a ajuda de plastificantes e agentes de nucleação, uma grande melhora no processamento pode ser alcançada. Atualmente o processo de obtenção do P(3HB) possui custo relativamente alto, embora ainda seja bem menor do que outros polímeros biodegradáveis. Hoje, a Zeneca Bioproducts (Inglaterra) produz o polímero por cerca de U\$10.00 a 12.00/kg. No Brasil, a PHB Industrial exporta para o mercado europeu o polímero a partir do açúcar da cana (Copersucar) por cerca de U\$5.00/kg, custo

significativamente inferior ao concorrente internacional, pois a matéria-prima é abundante no Brasil (VASCONCELOS, 2002).

Para o desenvolvimento de polímeros biodegradáveis ou na modificação dos polímeros existentes, é muito importante estabelecer critérios de avaliação da degradabilidade desses materiais. Vários métodos têm sido usados para avaliar a biodegradabilidade dos polímeros pela comparação da perda de massa, das propriedades mecânicas e da massa molar antes e depois da degradação, ou pelo monitoramento da quantidade de produto degradado (KIM *et al.*, 2000).

Gassner e Owen (1992) estudaram a estrutura e as propriedades mecânicas do copolímero de P(3HB-*co*-3HV) comercialmente produzido como Biopol, com copolímeros de etileno e acetato de vinila. Entretanto, como o etileno e o acetato de vinila não são degradados por fungos e bactérias, esses materiais são apenas parcialmente biodegradáveis.

Estudos posteriores de Gassner e Owen (1994) avaliaram as propriedades físicas das blendas de P(3HB)/PCL (poli  $\epsilon$ -caprolactona)). Apesar de imiscíveis em escala molecular, os autores constataram que as blendas apresentavam propriedades mecânicas compatíveis para determinadas aplicações.

Kumagai e Doi (1992b) investigaram a miscibilidade, a morfologia e a biodegradabilidade de blendas de P(3HB)/PCL e também concluíram que tais polímeros são imiscíveis no estado amorfo. Micrografias obtidas por meio de microscopia eletrônica de varredura (SEM) e avaliações das propriedades mecânicas indicaram uma estrutura de macrodomínios separados.

#### *1.4 Outros polímeros biodegradáveis*

Alguns estudos no desenvolvimento de bioplásticos podem ser citados, a exemplo dos realizados nas indústrias Fertec (Ferruzzi, Ricerca Technology), da Itália, e Warner Lambert, dos Estados Unidos. Os mais recentes têm focado a conversão de amido em material termoplástico com

aplicação no encapsulamento de remédios (LUENGO *et al.*, 2003) e embalagens alimentares (LAROTONDA, 2004). O amido é uma fonte de baixo custo e abundantemente disponível na natureza; é totalmente biodegradável em uma ampla variedade de ambientes e pode ser usado no desenvolvimento de produtos totalmente descartáveis. Dentre as culturas produtoras de amido, a mais utilizada no Brasil é a mandioca. O Brasil é o segundo produtor mundial da raiz, atrás apenas da Nigéria. Larotonda *et al.* (2004), por meio de reações de acetilação (esterificação) ou gelatinização, usaram amido de mandioca para a formação de filmes biodegradáveis. Os filmes formados por acetilação do amido mostraram-se transparentes e quebradiços; os obtidos por gelatinização do amido resultaram transparentes e resistentes à tração.

A celulose bacteriana pode ser aplicada em áreas onde a celulose de plantas dificilmente poderia ser usada. Novas aplicações têm sido descritas, como espessante em alimentos, cosméticos etc., ou papel para “reparo” de velhos documentos. Filmes de celulose podem ainda ser utilizados como substitutos temporários de pele humana no caso de queimaduras e úlceras. Biofill, Bioprocess e Gengiflex são produtos de celulose microbiana que têm ampla gama de aplicações em cirurgias e implantes dentais (JONAS e FARAH, 1998).

Outro polímero biodegradável – Bioceta – também baseado em celulose é desenvolvido pela Rhone Poulenc, na Bélgica. Combinado com aditivos, ele acelera a degradação por parte dos microrganismos. A empresa Sekisui Chemistry, do Japão, desenvolveu um polímero a partir da copolimerização de dois compostos químicos biodegradáveis baseados em derivados de poliésteres alifáticos (MARANGONI, 2000).

Os polissacarídeos foram provavelmente os primeiros a serem utilizados dentre os polímeros produzidos microbiologicamente; eles ocorrem como reserva de energia e como materiais estruturais em paredes celulares e cápsulas extracelulares (HIGGINS *et al.*, 1995). Destacam-se a goma xantana, que é comercializada, e o ácido hialúrico, que é usado em cirurgias oftalmológicas. Outro polissacarídeo que se destaca é a pululana, muito aplicado na indústria cosmética, em alimentos dietéticos e como polímero biodegradável (LUONG *et al.* 1988).

Os ácidos polimálicos são os únicos biopoliésteres solúveis em água. Esse homopoliéster é sintetizado por *Physasum polycephalum* e por poucos microrganismos eucarióticos, como o *Penicillium cyclopium* e o *Aureobasidium pullulans*. Nenhuma outra bactéria identificada até hoje tem a capacidade de produzir o ácido polimálico. A biossíntese desse poliéster ainda não é suficientemente conhecida, e a polimerização parece ocorrer por meio de mecanismos diferentes das bactérias produtoras de outros poliésteres (STEINBÜCHEL e DOI, 2002).

Os polifosfatos são sintetizados por microrganismos procariontes e eucariontes; esses últimos, incluindo os mamíferos, presumivelmente estocam polifosfatos como fonte de energia. Nas células, ocorrem principalmente como inclusões citoplasmáticas com cátions complexos divalentes. Tanto a biossíntese quanto a degradação desse poliéster têm sido muito estudadas (STEINBÜCHEL e DOI, 2002).

Filmes biodegradáveis a partir de fontes protéicas têm, nas últimas décadas, atraído a atenção por seu uso potencial como barreira protetora de alimentos. Martelli e colaboradores (2005) avaliaram o uso de filmes de queratina (proteína fibrosa contida em cabelo, lã, couro, unha e penas de mamíferos, répteis e pássaros) contendo diferentes plastificantes. Como resultado, os autores verificaram que os plastificantes polietilenoglicol (PEG 4000) e sorbitol apresentavam diferentes microestruturas, o que interferiu nas propriedades dos filmes. Os filmes elaborados com PEG 4000, que possui longas cadeias, resultaram mais quebradiços que os filmes feitos com sorbitol, que se apresentaram mais heterogêneos.

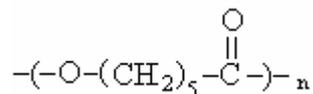
#### *1.4.1 Poli( $\epsilon$ -caprolactona) - PCL*

Embora os poli( $\alpha$ -hidroxiácidos), derivados dos ácidos láctico e glicólico, sejam considerados os mais importantes membros da família dos poliésteres alifáticos, os poli( $\beta$ -hidroxiácidos) e outros poliésteres alifáticos, como a poli( $\epsilon$ -caprolactona), são também de grande importância. Basicamente, tais polímeros têm aplicações na área ambiental e agrícola na liberação controlada de pesticidas (SUAVE *et al.*, 2005) ou inseticidas em agricultura, em embalagens, filmes

protetores para o transporte de pequenas mudas para o local de plantio e no plantio antecipado (POTTS, 1978; RAGHAVAN, 1995). No entanto, os poliésteres alifáticos constituem uma das famílias de polímeros mais atrativas e promissoras para aplicações na área biomédica, pois são biocompatíveis e biorreabsorvíveis, tendo sido pesquisados para aplicação em liberação controlada de fármacos (ENGELBERG e KOHN, 1995).

Os principais membros da família dos poliésteres alifáticos são o poli(ácido láctico) (PLA), o poli(ácido glicólico) (PGA), o poli(3-hidroxi-butilato) (P3HB), a poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) e a poli(*para*-dioxanona) (PPDO).

A poli( $\epsilon$ -caprolactona) – PCL – cuja estrutura é mostrada na figura 1.4, é um poliéster sintético alifático derivado da polimerização por abertura de anel da  $\epsilon$ -caprolactona, que consiste de 6 hidróxi-hexanoatos (KIM e RHEE, 2003), semicristalino (com aproximadamente 50% de cristalinidade). A PCL possui ponto de fusão relativamente baixo, 60°C, temperatura de transição vítrea em -70°C e tem sido pesquisada em muitas aplicações devido à sua alta biodegradabilidade (ROSA *et al.*, 2000).



**Figura 1.4** Estrutura da molécula de PCL

Outra propriedade interessante da PCL é a sua propensão a formar blendas miscíveis com uma grande variedade de polímeros. Blendas de PCL com polipropileno ou polietileno possuem alta tenacidade. Blendas de PCL com amido ou acetato de amido apresentam alto módulo de elasticidade e podem ser utilizadas para sacolas de compras. Além disso, a PCL pode ser copolimerizada com uma variedade grande de monômeros, tais como óxido de etileno, cloropreno,  $\delta$ -valeractona e acetato de vinila (KOENIG e HUANG, 1995). A biodegradação de PCL e suas blendas, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, tem sido estudada por muitos autores (FIELD *et al.*, 1974; TOKIWA *et al.*, 2002; WOODWARD *et al.*, 1985; KOENIG e HUANG, 1995). Foram relatados na literatura dois tipos de enzimas – lipase e esterase – que degradam a PCL (TOKIWA *et al.*, 2002; PARK *et al.*, 1993).

Acredita-se que a biodegradação desse polímero ocorra em, no mínimo, dois estágios discretos. O primeiro estágio envolve a hidrólise não-enzimática das ligações ésteres, autocatalisada pelos grupos carboxílicos ácidos finais do polímero (WOODWARD *et al.*, 1985). Sob certas circunstâncias, a PCL pode ser degradada enzimaticamente, ocorrendo erosão na superfície. A biodegradação da PCL com alta massa molar foi estudada por Potts *et al.* (1972), tendo sido observado que as amostras enterradas em solo foram totalmente degradadas após um ano.

### 1.5 Microrganismos responsáveis pela produção de PHAs

Os microrganismos capazes de acumular PHAs são geralmente bactérias gram-positivas e gram-negativas, distribuídas em mais de 75 gêneros diferentes (REDDY *et al.*, 2003), que podem ser encontrados em uma ampla diversidade de *habitats*, isto é, no solo, na água do mar, em efluentes etc. A seleção do microrganismo e do substrato tem grande influência no custo de fabricação do PHA (ANDERSON e DAWES, 1990). É desejável também que as cepas tenham velocidade específica de crescimento e de produção de PHA elevadas, que possam utilizar substratos de baixo custo, que apresentem uma porcentagem elevada de PHA em relação à massa total seca e, finalmente, é importante que haja um fator de conversão de substrato em PHA bastante elevado (RAMSAY *et al.*, 1990).

São conhecidos mais de 300 microrganismos capazes de sintetizar PHAs, mas somente poucas bactérias são consideradas potenciais na produção industrial de PHA, tais como *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, vários isolados de metilotrofos, *Pseudomonas oleovorans* e, recentemente, as linhagens recombinantes *Ralstonia eutropha* (antes denominada *A. eutrophus*), *Escherichia coli* e *Klebsiella aerogenes*. Essas bactérias foram selecionadas principalmente porque podem ser eficientemente cultivadas com alta densidade celular, acumulando alta concentração de PHA em um período relativamente curto de tempo, o que resulta em alta produtividade (definida como grama de PHA produzido por litro, por hora). A alta produtividade é

um fator muito importante para que se consiga diminuir os custos de produção dos polímeros biodegradáveis (LEE, 1996a).

Contudo, as bactérias que apresentam as características mais favoráveis para a produção industrial são *Azotobacter sp.*, *Methylobacterium sp.* e *Ralstonia eutropha* (BYROM, 1992), essencialmente em razão da variedade de substratos que elas podem utilizar. Além disso, existe também a possibilidade da utilização de genes recombinantes em outras bactérias que não são naturalmente produtoras de PHA (LEE, 1996b) ou em plantas transgênicas para a produção de PHA (BYROM, 1992).

As bactérias utilizadas na produção de PHA podem ser divididas em dois grupos, com base nas condições de cultura requeridas para a síntese de PHA. O primeiro grupo necessita de limitação em algum nutriente essencial – como N, P, Mg, K, O ou S – e excesso de fonte de carbono para uma síntese eficiente. Já o segundo grupo não requer limitação de nutriente para a síntese de PHA, e é capaz de acumular o polímero durante a fase de crescimento. *A. eutrophus*, *P. oleovorans* e muitas outras bactérias pertencem ao primeiro grupo, enquanto *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* e a *E. coli* recombinante pertencem ao segundo grupo (LEE, 1996a).

Muitos estudos têm sido conduzidos em ensaios com alta densidade celular para a produção de P(3HB). Os parâmetros de fermentação usados Choi e Lee (1997) na análise econômica do processo de produção de P(3HB) podem ser visualizados na tabela 1.4.

**Tabela 1.4** Dados de fermentação utilizados na análise de processo e avaliação econômica

<b>Microrganismo</b>	<b><i>A. eutrophus</i></b>	<b><i>A. latus</i></b>	<b><i>M. organophilum</i></b>	<b><i>E.coli</i> recombinante</b>
Fonte de carbono	glicose	sacarose	metanol	soro de queijo
Nutriente limitante	nitrogênio	nenhum	potássio	nenhum
Estratégia	Controle conc. de glicose	pH - stat	Controle conc. de metanol	pH - stat com reciclo de células
Tempo de cultivo (h)	50	28,45	70	40
Concentração de células (g/L)	164	143	250	194
Concentração de P(3HB) (g/L)	121	71,4	130	168
Conteúdo de P(3HB)%	76	50	52	87
Produtividade de P(3HB) (g.L <sup>-1</sup> .H <sup>-1</sup> )	2,42	2,5	1,86	4,6
Fator de conversão	0,3	0,17	0,19	Nd

em P(3HB) ( $Y_{P/S}$ )				
kg substrato/kg de P(3HB)	3,33	5,88	5,26	Nd
Referências	Kim <i>et al.</i> , 1994	Yamane <i>et al.</i> , 1996	Kim <i>et al.</i> , 1996	Ahn <i>et al.</i> , 2001

Nd: não disponível

Fonte: adaptada de CHOI e LEE, 1997 e AHN *et al.*, 2001.

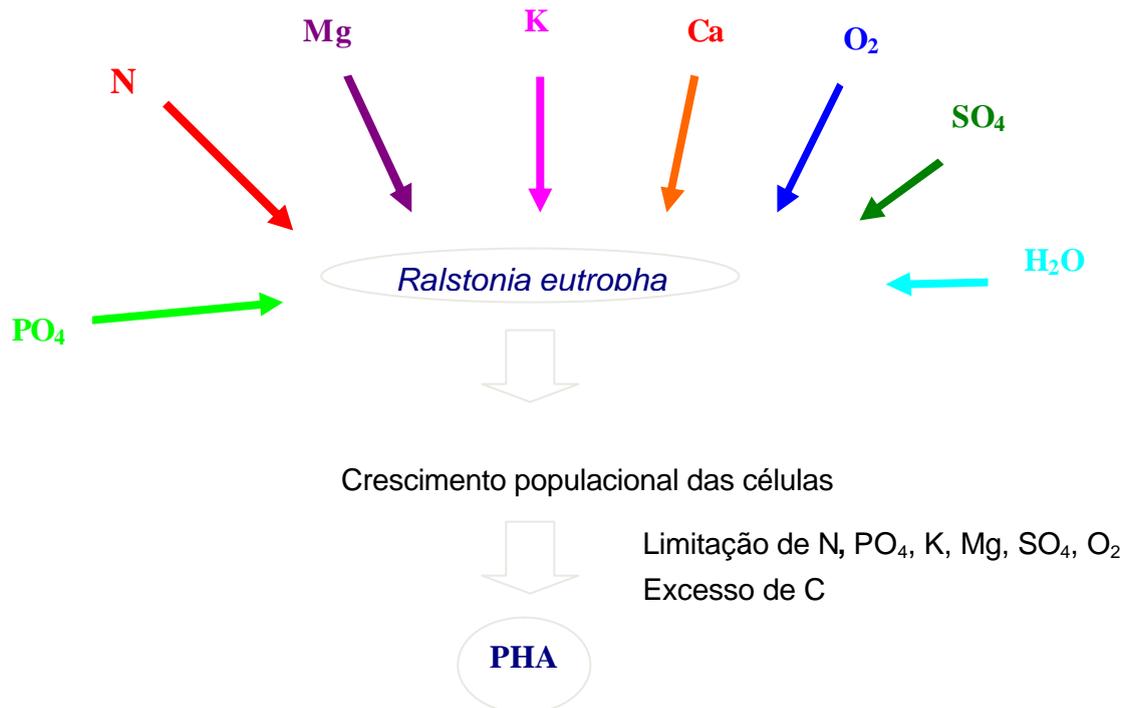
### 1.5.1 *Ralstonia eutropha* (atualmente *Cupriavidus necator*)

É um microrganismo procariótico, do tipo gram-negativo, encontrado naturalmente no solo e na água. Essa espécie apresenta células na forma de bastonete, é móvel e possui de 1 a 4 flagelos peritríquios. As células podem tornar-se esféricas na fase estacionária de crescimento (MARANGONI, 2000).

A bactéria *R. eutropha* é capaz de crescer em condições de quimiolitotrofia ou heterotrofia (REUTZ *et al.*, 1982). A quimiolitotrofia é a capacidade que os microrganismos têm de utilizar os compostos inorgânicos como doadores de elétrons e o dióxido de carbono como fonte de carbono. A heterotrofia é a capacidade de utilizar compostos orgânicos como fonte de carbono e energia (DOELLE, 1975). A temperatura ótima de crescimento dessa bactéria é de 30°C e o pH de 6,9 (REPASKE e MAYER, 1976), podendo crescer autotroficamente em atmosfera de gases H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> (TANAKA *et al.*, 1994) e CO (VOLOVA *et al.*, 2002). O pH na cultura de *Ralstonia eutropha* geralmente decresce devido à produção de subprodutos no ciclo de Krebs, sendo o controle do pH em biorreatores feito com as soluções de ácido ou base (RAMSAY *et al.*, 1990).

O acúmulo de PHA, na forma de grânulos, em *Ralstonia eutropha* e demais bactérias pertencentes ao primeiro grupo de microrganismos produtores desse polímero, geralmente ocorre quando existe excesso de fonte de carbono e limitação de algum nutriente essencial à multiplicação das bactérias. Trata-se de uma síntese que ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, na maioria dos microrganismos, procura-se

favorecer ao máximo o crescimento celular e assegurar, ao mesmo tempo, que a síntese do polímero seja a menor possível. Inversamente, na segunda etapa, interrompe-se o crescimento celular e estimula-se ao máximo o acúmulo de polímero nas células (figura 1.5) (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997).



**Figura 1.5** Desenho esquemático demonstrando como ocorre a produção de PHA por *Ralstonia eutropha*

Os PHAs sintetizados pela *R. eutropha* podem conter monômeros de 3-hidroxivalerato (3HV), 3-hidroxibutirato (3HB), 4-hidroxibutirato (4HB), 5-hidroxivalerato (5HV) quando ácido valérico ou propiônico são fornecidos (REE *et al.*, 1992).

*Ralstonia eutropha* é o microrganismo mais atraente para a produção industrial por acumular mais de 80% de sua massa celular em P(3HB) com alta massa molar e utilizar diferentes tipos de substratos (BYROM, 1987), como glicose (espécie mutante) ou frutose, formiato, acetato, propionato, lactato, glutamato, succinato, fenobenzoato (TANAKA *et al.*, 1994), soro de leite fermentado (MARANGONI *et al.*, 2000), ácido láctico, sacarose, melão, glicerol, lactose (KHANNA, *et al.*, 2005), ácido butírico, 1,4 butanodiol, 4-clorobutírico (KUNIOKA *et al.*, 1989)

e os açúcares invertidos de cana-de-açúcar (RAMSAY *et al.*, 1990), podendo ainda utilizar outras fontes como etanol, ácido oléico (AKIYAMA *et al.*, 1992) e até mesmo dióxido de carbono (LEE, 1996a.). O gene recombinante para a produção de PHA é relativamente estável e pode ser usado em fermentações com alta densidade celular (TAGUCHI *et al.*, 2003).

O produto da cultura microbiana é um polímero totalmente natural e biodegradável que, lançado no ambiente, sofre a ação de microrganismos, podendo ser degradado completamente em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. A degradação é ainda mais rápida se o material for depositado no solo, onde existe maior concentração de bactérias e fungos, tanto aeróbios quanto anaeróbios (JUSTI, 1991).

### 1.5.2 *Alcaligenes latus*

O uso deste microrganismo é interessante para a produção de P(3HB), uma vez que é capaz de utilizar diferentes substratos com uma velocidade específica de crescimento elevada, acumulando grandes quantidades de polímero já na fase de crescimento. Também é capaz de utilizar sacarose com eficiência e, como recurso para baixar o custo de produção, o melaço de cana-de-açúcar também pode ser utilizado (LEE, 1996a).

O acúmulo de PHA por esse microrganismo foi considerado muito baixo por Yamane *et al.* (1996), que obtiveram menos de 50% de polímero em biomassa em condições não limitantes. Contudo, Wang e Lee (1997), trabalhando sob limitação de nitrogênio, conseguiram um conteúdo de P(3HB) em biomassa de 88%.

A principal desvantagem atribuída a essa espécie é a sua sensibilidade aos precursores utilizados para a produção do copolímero P(3HB-co-3HV), ou seja, o crescimento de *A. latus* é completamente inibido em presença de ácido propiônico na concentração de 0,5g/L<sup>-1</sup> (RAMSAY *et al.*, 1990; BRAUNEGG *et al.*, 1998).

### 1.5.3 *Azotobacter vinelandii*

O microrganismo *Azotobacter vinelandii* é capaz de acumular P(3HB) durante a fase de crescimento, utilizando a glicose como fonte de carbono, em culturas de batelada alimentada. A concentração de P(3HB) é de  $32\text{g/L}^{-1}$  e pode ser obtida em 47 horas, com um fator de conversão relativamente bom de  $0,34\text{g}$  de P(3HB) por grama de glicose, utilizando-se peptona de peixe como suplemento. Contudo, a produtividade de  $0,34\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$  foi considerada baixa, o que torna necessário o desenvolvimento de melhores estratégias de cultivo (LEE, 1996a).

Outro aspecto negativo desse microrganismo é o fato de produzir, paralelamente ao P(3HB), um polissacarídeo, o que torna o processo de difícil controle (BYROM, 1987).

### 1.5.4 *Organismos metilotróficos*

Os organismos metilotróficos foram estudados por Bourque *et al.* (1992), que consideram o metanol um substrato interessante por ser de custo relativamente baixo e de fácil manuseio.

O P(3HB) pode ser produzido por batelada alimentada por *Pseudomonas extorquens*. Entretanto, a produtividade, num cultivo longo de 170 horas, mostrou-se muito baixa ( $0,88\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ). Em outro estudo, culturas em batelada alimentada de *Methylobacterium organophilum*, com limitação em potássio, atingiram maior produtividade ( $1,86\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ). Mas o conteúdo celular de PHA no interior das células foi de aproximadamente 52% da massa celular resultando em um fator de conversão de  $0,19\text{g}$  de P(3HB) por grama de metanol. Essa é a maior desvantagem do emprego de organismos metilotróficos; por isso faz-se necessário desenvolver técnicas para aumentar o conteúdo intracelular de PHA (LEE, 1996a).

### 1.5.5 *Pseudomonas* ssp

Haywood *et al.* (1988) examinaram várias espécies de *Pseudomonas* e demonstraram o acúmulo de polímero em *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens* e *P. testosteroni*, em extensa variedade de substratos.

De Smet *et al.* (*apud* ANDERSON e DAWES, 1990) observaram a presença de grânulos intracelulares de P(3HB) em *P. oleovorans*. Subseqüentemente descobriu-se que, ao se alimentar *P. oleovorans* com n-octano, havia a produção de um polímero contendo 3-hidroxi-octanoato e 3-hidroxi-hexanoato em maior e menor quantidade, respectivamente, o que demonstrou que *P. oleovorans* não sintetizava somente P(3HB) (LAGEVEEN, 1988).

Lee (1996b) observou que *P. oleovorans* é a única bactéria que pode ser empregada para produzir PHA com cadeia média de carbono (C<sub>6</sub> – C<sub>14</sub>) e com concentração em PHA relativamente alta.

Ramsay e colaboradores (1995) avaliaram o uso de hemicelulose (xilose) como substrato potencial para produção de P(3HB) por *Pseudomonas cepacia* (reclassificada como *Burkholderia cepacia*) (GOMEZ *et al.*, 1997). Os resultados mostraram velocidade específica máxima de crescimento, velocidade específica máxima de produção de P(3HB), fator de conversão de substrato em células, fator de conversão de substrato em P(3HB) e conteúdo em P(3HB) iguais a 0,22h<sup>-1</sup>, 0,072g.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, 0,29g.g<sup>-1</sup>, 0,11g.g<sup>-1</sup> e 45% (m/m), respectivamente. Considerando o custo da xilose, os custos do substrato na produção de P(3HB) seriam reduzidos pela metade quando comparados à glicose (substrato atualmente utilizado industrialmente pela ZENECA) e equivalente ao melão.

### 1.5.6 *Escherichia coli*

Existem inúmeros relatos do emprego de *Escherichia coli* recombinante para a produção de vários bioprodutos, principalmente proteínas. Os genes da biossíntese de

PHA de *Ralstonia eutropha* foram clonados em *Escherichia coli* por três grupos independentes em 1988 e 1989. Esses genes foram seqüenciados e caracterizados em detalhes (SCHUBERT *et al.*, 1988).

O uso de *Escherichia coli* recombinante para a biossíntese de PHA é atrativo, pois essa bactéria é capaz de acumular cerca de 90% de sua biomassa em PHA (LEE e CHANG, 1995). Além disso, ela pode utilizar várias fontes de carbono, o que permite a produção de P(3HB) a partir de matérias-primas de baixo custo (AHN *et al.*, 2001; ARRUDA e ANTÔNIO, 2003).

Lee (1996b) enumerou algumas vantagens do emprego de *Escherichia coli* na produção de PHA: (1) rápido crescimento e alta densidade celular, que resultam em alta produtividade; (2) acúmulo de grandes quantidades de polímero; (3) habilidade em utilizar grande variedade de fontes de carbono de baixo custo; (4) facilidade de purificação do PHA, e (5) carência de sistema ativo de despolimerase que atue contra a síntese de polímeros.

Uma desvantagem é que *Escherichia coli* não utiliza eficientemente ácido propiônico, o que torna a produção do P(3HB-co-3HV) difícil. No entanto, por meio de técnicas de DNA recombinante o maior valor de produtividade ( $4,63\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) em P(3HB), tendo glicose como fonte de carbono, foi obtido com o uso de *Escherichia coli* recombinante. Nessa cultura, a concentração de P(3HB) e o conteúdo de P(3HB) nas células secas alcançaram  $142\text{g.L}^{-1}$  e 73% respectivamente em 30h (TSUGE, 2002).

Existem relatos de culturas com alta densidade celular de *Escherichia coli* recombinante e não recombinante. O maior problema do emprego da bactéria recombinante em culturas de alta densidade celular é a necessidade de oxigênio purificado, o que eleva os custos de produção do polímero (LEE e CHANG, 1995).

### 1.5.7 Culturas mistas

É sabido que o lodo ativado submetido a condições transientes, especialmente quando causadas por alimentação descontínua e variações na presença do elétron captor, é capaz de

armazenar grandes quantidades de PHA. O percentual pode atingir mais de 60% da massa do lodo seco. Quando comparado com a produção de PHA em culturas puras (acima de 80% da massa seca celular), aquele valor é ainda baixo, porém nenhum estudo de otimização do processo foi realizado até o momento. Custos do processo usando culturas mistas (por exemplo, lodo ativado) podem ser substancialmente reduzidos com o uso de substratos baratos e simples, reatores não-esterilizáveis e menos controles no processo (REIS *et al.*, 2003).

### 1.5.8 Plantas transgênicas

Com o objetivo de diminuir os custos de produção de PHA, muitas pesquisas têm sido realizadas investigando a possibilidade de produzir P(3HB) em plantas transgênicas. *Arabidopsis thaliana*, uma pequena planta oleaginosa, foi a primeira escolha para os estudos transgênicos (MADDISON e HUISMAN, 1999). Considerando que a  $\beta$ -cetotiolase, a primeira enzima da síntese de PHA (item 1.6), está presente no citoplasma dessas plantas, somente a redutase e a PHA-sintase seriam transferidas a partir de *R. eutropha* para a síntese de PHA nas células das plantas, o que resultaria em um acúmulo de grânulos de PHB no citoplasma, no vacúolo e no núcleo e um crescimento defeituoso da planta (LEE, 1996b; REDDY *et al.*, 2003).

A planta híbrida, expressando a enzima de síntese de PHA proveniente de *Ralstonia eutropha*, pode acumular P(3HB) em até 10mg/g de massa fresca, ou seja, cerca de 14% de massa seca. Esses dados mostram que a produção de P(3HB) a partir de plantas transgênicas pode ser economicamente viável se forem concentrados esforços na melhoria do processo (OJUMU, 2004).

A manipulação genética de plantas também tem se mostrado interessante, pois as plantas podem produzir PHAs diretamente por meio de CO<sub>2</sub> e energia solar e, teoricamente, os custos de produção podem ser comparados aos de outros polímeros produzidos pelas plantas, como os polifenóis. Mais tarde, esses genes da biossíntese de P(3-HB) também foram expressos em cultivares agrícolas como *Brassica napus*, *Gossypium hirsutum*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum* e *Zea mays* (STEINBÜCHEL e DOI, 2002).

A produção de PHA por meio do cultivo de plantas poderá permitir a síntese de polímeros biodegradáveis em uma escala de milhões de toneladas se comparada ao processo fermentativo, cuja escala é de milhares de toneladas. O PHA poderia ser potencialmente produzido a um custo de US\$ 0.20–0.50/kg, se sintetizado em plantas contendo 20% a 40% da massa seca em PHA e, assim, tornar-se competitivo com os polímeros convencionais derivados do petróleo (POIRIER *et al.*, 1995).

## 1.6 Biossíntese e regulação da síntese de polihidroxialcanoatos (PHA)

Em 1958, Macrae e Wilkinson (*apud* SUDESH *et al.*, 2000), estudando o metabolismo de PHA em *Bacillus megaterium*, observaram que o acúmulo de PHA ocorre em resposta a um desequilíbrio no crescimento, decorrente da limitação de nutrientes, a exemplo da formação das reservas de polifosfato e carboidratos. Quando faltam nutrientes (Mg, SO<sub>4</sub>, N, P, O) necessários à divisão celular, mas há um suprimento generoso de carbono, a bactéria estoca PHA.

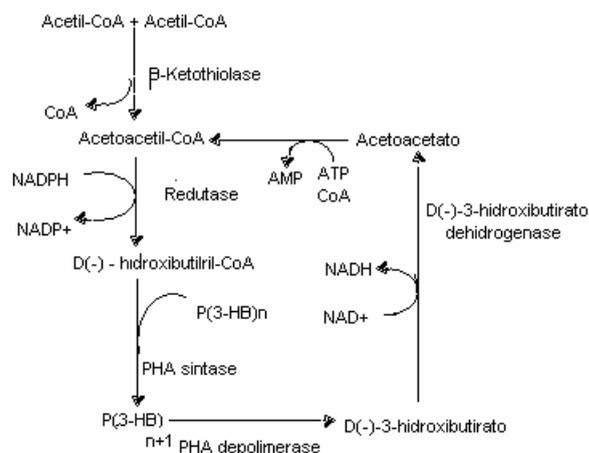
Um dos fatores que determinam o tipo de PHA constituinte é a fonte de carbono. Microrganismos são capazes de produzir PHA a partir de uma ampla variedade de fontes de carbono, desde fontes de custo mais baixo, como melão de beterraba e melão de cana-de-açúcar (HIGGINS, 1995; PAGE, 1992), até óleos vegetais (FUKUI e DOI, 1998) e seus ácidos graxos constituintes (EGGINK *et al.*, 1993; EGGINK *et al.*, 1995), alcanos e seus carboidratos simples (LAGEVEEN *et al.*, 1988). Com base no tipo de monômero incorporado, várias vias metabólicas têm sido apresentadas.

Como já foi mencionado anteriormente, a produção de PHA em *Ralstonia eutropha* acontece em duas fases: a fase sem limitação de nutrientes com o objetivo de geração de biomassa e outra fase com limitação de nutrientes (nitrogênio, fosfato, oxigênio etc.), que favorece o acúmulo do polímero de acordo com a fonte de carbono oferecida (DOI *et al.*, 1990).

Em *Ralstonia eutropha*, a biossíntese de P(3HB) é catalisada por três enzimas:  $\beta$ -cetotiolase (Pha A), acetoacetyl-CoA-redutase (Pha B) e Pha-sintase (Pha C) (SUDESH *et al.*, 2000), sendo duas moléculas de acetyl-CoA condensadas em acetoacetyl-CoA pela  $\beta$ -cetotiolase. O produto é então reduzido pela redutase NADPH-dependente a D(-)-3-hidroxiacetyl-CoA, que se liga a uma cadeia em crescimento de P(3HB) pela PHA-sintase. A rota biossintética de produção e degradação de P(3HB) intracelular por *R. eutropha* pode ser observada na figura 1.6 (LEE, 1996b).

Em condições balanceadas, a acetyl-CoA segue pelo ciclo do ácido cítrico, gerando energia e material celular. Em *Ralstonia eutropha*, os monômeros incorporados sempre contêm apenas 3–5 átomos de carbono. Isso leva à conclusão de que, nesse caso, a PHA-sintase utiliza como substrato monômeros de cadeia curta.

Os genes responsáveis pela produção dessas enzimas já foram expressos com sucesso em muitas bactérias, em *Saccharomyces cerevisiae*, em células animais e células vegetais, estabilizando-se em muitos casos e funcionando para a síntese de PHA (STEINBÜCHEL e DOI, 2002).

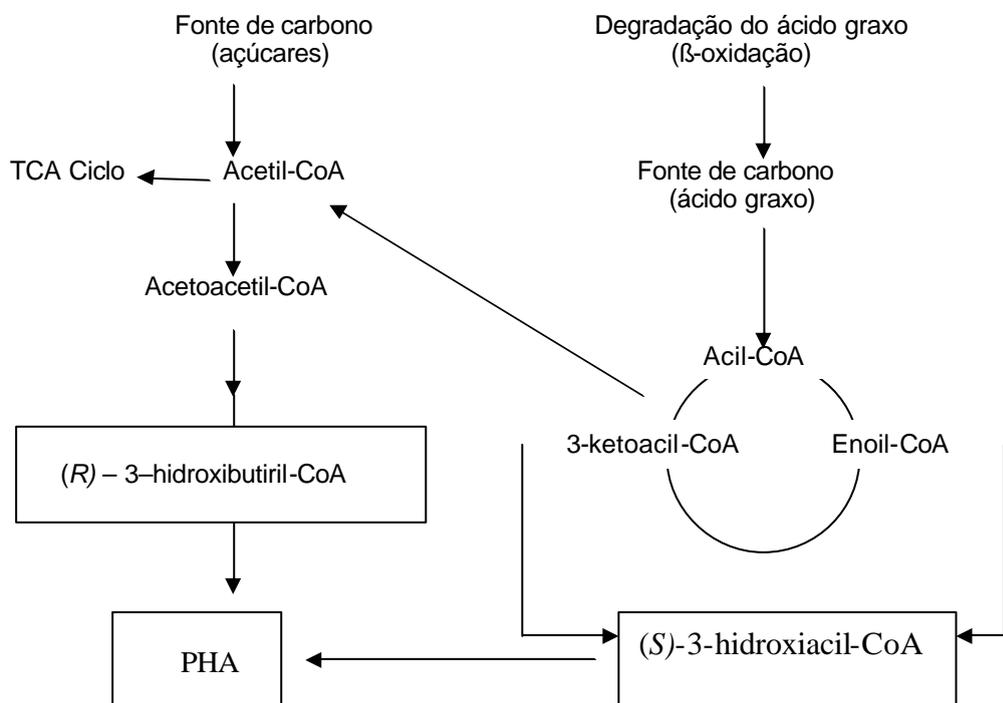


**Figura 1.6** Rota metabólica da síntese e degradação de poli(3-hidroxiacetylato) em *R. eutropha* (LEE, 1996b)

A limitação nutricional para a produção de P(3HB) pode ser em oxigênio, nitrogênio, fosfato, magnésio, como já mencionado anteriormente. Sob limitação em oxigênio, em células de *A. beijerinckii*, a relação  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  aumenta, resultando na inibição da citrato-sintase e isocitrato-desidrogenase pelo NADH. Os níveis de acetyl-CoA aumentam, porque a entrada para o ciclo do ácido cítrico (TCA) é reduzida; acetyl-CoA é então convertida para acetoacetyl-CoA pela 3-

cetotiolase. Como consequência, o fluxo de carbono é canalizado para a síntese de P(3HB). A síntese de P(3HB) sob limitação em oxigênio fornece à célula a possibilidade de diminuir o poder redutor. Quando os níveis de oxigênio são elevados, a concentração de CoA aumenta como resultado do acetil-CoA entrando no TCA; o que inibe a 3-cetotiolase e então diminui o fluxo de carbono em direção à síntese de P(3HB) (ANDERSON e DAWES, 1990). O mesmo acontece com *Ralstonia eutropha* sob limitação em nitrogênio, fósforo ou oxigênio. O papel central da acetil-CoA na biossíntese de P(3HB) foi comprovado quando Park e Lee (1996) (*apud* MERRICK, 2001) modificaram geneticamente uma linhagem de *Ralstonia eutropha* (isocitrato-desidrogenase negativa). Como consequência, os níveis de acetil-CoA aumentaram e isso resultou em um aumento da síntese de P(3HB).

Dessa forma, as condições necessárias para a síntese de PHAs são a elevada concentração de NADPH, a baixa concentração de CoA e a elevada concentração de acetil-CoA (DALCANTON, 2006 ).



**Figura 1.7** Via metabólica no suprimento de monômeros de hidroxialcanoato para síntese de PHA  
Fonte: LUENGO, *et al.*, 2003

Considerando que os ácidos graxos são fontes de carbono interessantes para a biossíntese de PHA, tem-se demonstrado que as vias bioquímicas envolvidas no metabolismo dos ácidos

graxos podem gerar vários monômeros de hidroxialcanoato para síntese de PHA (LAGEVEEN *et al.*, 1988). A utilização dos ácidos graxos pelas bactérias requer uma indução coordenada das enzimas da  $\beta$ -oxidação, mais o sistema de transporte dos ácidos graxos.

A figura 1.7 mostra as vias metabólicas na síntese de PHA associando o metabolismo de degradação dos carboidratos e dos ácidos graxos (LUENGO, *et al.*, 2003).

### 1.7 Estratégias e condições de cultivo visando à produção de P(3HB)

Desde que PHAs são sintetizados e acumulados em condições de crescimento desfavoráveis e na presença de excesso da fonte de carbono, é importante desenvolver estratégias de cultivo que simulem essas condições e permitam uma produção eficiente de PHA. Existem numerosos microrganismos que acumulam PHA e, portanto, a condição ideal para a produção do polímero será diferente de um organismo para o outro. Alguns organismos acumulam PHA em condições de limitação (*Ralstonia eutropha*, *Bacillus megaterium*), enquanto outros, como *Alcaligenes latus*, acumulam o polímero durante o crescimento (HRABAK, 1992). É necessário considerar também o metabolismo (síntese e degradação), uma vez que cultivos prolongados podem resultar em uma degradação do PHA pelas despolimerases (LEE e CHANG, 1995).

A seleção de um organismo para a produção industrial de PHA deve ser baseada em habilidades como: capacidade da célula em utilizar substratos baratos, velocidade de crescimento, velocidade de síntese do polímero, percentual de acúmulo do polímero. Os três últimos itens afetam diretamente a produtividade, que deve ser elevada. O fator de conversão de substrato em PHA é também importante, de forma a não se desperdiçar substrato com outro material que não PHA. Estratégias básicas de produção de PHA podem ser desenvolvidas com base nos fatores de conversão e produtividade (YAMANE, 1992, 1993).

Embora Repaske e Mayer (1976) já relatasse que o pH ótimo para o crescimento e a produção de P(3HB) por *Ralstonia eutropha* era de 6,9 e que um pH de 5,4 inibia o seu

crescimento, Grothe e colaboradores (1999) verificaram a influência do pH inicial (6,0 a 8,5) e da temperatura (25 a 37°C) sobre o crescimento de *Alcaligenes latus* e a produção de P(3HB). Os valores de pH 6,5 e 7,0 e a temperatura de 33°C forneceram os melhores resultados. No entanto, os autores relatam que o efeito da temperatura na faixa estudada foi negligenciável.

Atualmente, os cultivos visando à produção de P(3HB) por *Ralstonia eutropha* têm sido conduzidos em pH igual a 7,0 e a 30°C (ASENJO, 1995; YAN *et al.*, 2003; KAHAR *et al.*, 2004; SHAHHOSSEINI, 2004; KHANNA *et al.*, 2005).

Considerando-se que os custos de produção dos polímeros biodegradáveis ainda são elevados quando comparados àqueles quimicamente sintetizados, muitos pesquisadores têm focado o uso de fontes de carbono baratas para uma produção eficiente de PHA. Usando açúcares de baixo custo como fonte de carbono, a produção de P(3HB) com alta produtividade tem sido alcançada em processos otimizados (LEE e CHANG, 1995). No entanto, a despeito de muitos esforços, a produção de P(3HB) a partir de carboidratos tem a desvantagem de levar a um baixo fator de conversão em PHA. O fator de conversão de P(3HB) a partir de glicose pode alcançar 0,4g P(3HB)/g carboidrato consumido. Em decorrência dessas limitações, óleos vegetais têm sido utilizados como reserva energética para a produção de PHA, uma vez que também são considerados fontes de carbono de baixo custo (OJUMU, 2004).

Akiyama *et al.* (1992) estudaram o cultivo em batelada de *Alcaligenes* sp, utilizando ácidos graxos de cadeia longa (C2 a C22), óleos vegetais e ácidos graxos de origem animal como única fonte de carbono a 3,0g/L. Como resultado, os autores concluíram que os óleos vegetais e ácidos graxos de origem animal testados foram bons substratos tanto para o crescimento celular quanto para a produção do polímero, ressaltando que a produção de P(3HB) ocorreu quando a fonte de carbono continha números pares de carbono, enquanto o

copolímero P(3HB-*co*-3HV) foi produzido a partir de moléculas com números ímpares de carbono.

A produção de PHA por *Alcaligenes eutrophus* e uma linhagem recombinante a partir de azeite de oliva foi avaliada por Fukui e Doi (1998). As cepas foram cultivadas por 72h em meio mineral limitado em nitrogênio, contendo azeite de oliva (1% V/V) como única fonte de carbono. Os resultados mostraram que, como os açúcares, os óleos vegetais são excelentes fontes de carbono tanto para o crescimento quanto para a biossíntese de PHA por *Alcaligenes eutrophus* (foi verificado um acúmulo em torno de 80% de sua massa seca em P(3HB)). Nesse caso, os autores sugeriram que o microrganismo libera uma lipase extracelular que hidrolisa os triglicerídeos do meio resultando na incorporação dos ácidos graxos pelas células e sua metabolização para acetil-CoA, via  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos.

Em contraste com as outras fontes de carbono, o fator de conversão teórico para a produção de PHA a partir de óleos vegetais é de cerca de 1,0g PHA/g óleo vegetal, uma vez que há um maior número de átomos de carbono por massa em sua composição (AKIYAMA *et al.*, 2003).

Kahar *et al.* (2004) produziram P(3HB) a partir da linhagem selvagem de *Ralstonia eutropha* H16 e de uma linhagem recombinante, tendo óleo de soja como única fonte de carbono. Mantendo a concentração de óleo de soja em torno de 20g/L ao longo de todo o processo, e após 96h de cultivo, os autores obtiveram 126g/L de células contendo 76% (m/m) de P(3HB). O fator de conversão para a produção de PHA a partir de óleo de soja foi de 0,76g (PHA)/g óleo vegetal utilizado em função da elevada composição em número de átomos de carbono no óleo vegetal e com valor de produtividade em PHA calculado em  $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ .

Rodrigues (2005) utilizou uma solução de amido hidrolisado como fonte de carbono para o cultivo de *R. eutropha*, com e sem adição de ácido oléico e óleo de soja no início da fase de produção do polímero. Os conteúdos de P(3HB) e produtividade máxima em polímero, obtidos para as culturas sem suplementação, com suplementação de ácido oléico e

com suplementação de óleo de soja foram, respectivamente 46% e  $0,22\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ; 50,5% e  $0,37\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ; 56,7% e  $0,49\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ .

A bactéria *P. putida* foi cultivada na presença de ácido oléico (15g/L) como única fonte de carbono para obtenção de elevada concentração de PHA<sub>MCL</sub>. Os ensaios conduzidos em frascos agitados revelaram que o fator de conversão de substrato em células foi igual a 0,6g/g. Para os ensaios conduzidos em biorreator após 28,7h de cultivo, a concentração final de células, a concentração de PHA e o conteúdo em PHA foram de 173g/L, 32,3g/L e 18,7% respectivamente, o que resultou em uma produtividade em produto igual a  $1,13\text{g PHA}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  (LEE *et al.*, 2000).

Contudo, o cultivo de bactérias utilizando óleos vegetais ou ácidos graxos como única fonte de carbono tem tido alguns inconvenientes. O maior problema está relacionado aos baixos valores para velocidade específica de crescimento para as bactérias produtoras de PHA (TSUGE, 2002; KAHAR *et al.*, 2004). A fim de minimizar esses problemas, alguns pesquisadores associaram o uso de fontes de carbono de baixo custo, como, por exemplo, resíduos da indústria de alimentos e resíduos agroindustriais, com a adição de óleos vegetais ou ácidos graxos.

Lee e Choi (1999) usaram ácido oléico em culturas geneticamente modificadas de *E. coli* e observaram aumento no acúmulo do copolímero. Uma das explicações para o uso desse suplemento é o fato de o ácido oléico ser usado pela bactéria para o crescimento durante a fase de produção, disponibilizando ácido propiônico para a produção de 3HV. No entanto, estudos complementares realizados por Marangoni *et al.* (2000) mostraram que, embora tenha havido um incremento na produção do copolímero por *R. eutropha* com o uso de ácido oléico, a fração mássica que de fato sofreu aumento foi o 3HB. Squio (2003) ampliou os estudos incluindo o ácido linoléico e, embora tenha havido um aumento na produção do copolímero em cerca de 11%, os resultados apontaram uma redução na fração de HV quando os ácidos graxos foram utilizados. Continuando a busca por suplementos nutricionais que pudessem

umentar a produção do copolímero e tendo sido verificado que os ácidos graxos oléico e linoléico podem ser eficientemente utilizados, os estudos para a produção de copolímero seguiram com o uso de óleos vegetais (soja, milho, algodão, oliva, girassol e dendê). Mais uma vez foi observado um aumento na produção do copolímero em aproximadamente 10% (SQUIO, 2003).

## 1.8 Vantagens e aplicações dos PHAs

O grande diferencial do P(3HB) é que, enquanto os polímeros de origem petroquímica levam mais de 500 anos para se decompor, as resinas plásticas biodegradáveis decompõem-se em torno de 12 meses, dependendo do meio em que se encontram. Em fossas sépticas, a perda de massa chega a 90% em seis meses, enquanto em aterros sanitários a degradação atinge 50% em 280 dias. Ao se decompor, as resinas plásticas transformam-se em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, sem liberação de resíduos tóxicos ([www.inventabrasilnet15.com.br](http://www.inventabrasilnet15.com.br)) (VASCONCELOS, 2002).

As aplicações do P(3HB) e dos PHAs em geral estão diretamente ligadas às suas propriedades específicas: mecânicas, físicas, térmicas, de biocompatibilidade, de biodegradação, entre outras. Tais aplicações incluem desde artigos de higiene, limpeza, cosméticos e produtos farmacêuticos até embalagens de produtos agrícolas, tais como sacos e vasilhames para fertilizantes e defensivos agrícolas, vasos para mudas, produtos injetados como brinquedos e material escolar (REHM e REED, 1988; VASCONCELOS, 2002).

Os PHAs têm atraído considerável interesse industrial, por serem biodegradáveis e biocompatíveis. Particular atenção tem merecido o fato de terem sido encontrados produtos da degradação do P(3HB), como intermediários metabólicos presentes em grande número de animais. P(3HB) com baixa massa molar foi encontrado em organismos procarióticos e eucarióticos, parecendo funcionar como componente de um canal iônico da membrana celular. Recentemente, foi detectada a presença de quantidades relativamente altas no sangue

humano. Portanto, considera-se que implantes de P(3HB) em tecidos de mamíferos não sejam tóxicos (CHEN & WU, 2005).

Investigações biomédicas dos polímeros P(3HB) e blendas de P(3HB)/P(3HV) realizadas por Volova e colaboradores (2003) mostraram que os implantes não causaram efeito adverso nos parâmetros fisiológicos, bioquímicos e funcionais nos animais no período pós-cirúrgico.

Os filmes de P(3HB) também têm tido potencial interesse para o uso em embalagens de alimentos com baixa difusão de oxigênio (REHM e REED, 1988; BUCCI *et al.*, 2005).

Ainda que os PHAs tenham sido considerados potenciais na produção de artigos de primeira necessidade (BYROM, 1987), atualmente eles têm sido muito investigados nos campos médico e farmacêutico, particularmente na confecção de cápsulas para liberação controlada de fármacos (SUAVE, 2005), medicamentos, hormônios, inseticidas e herbicidas (REDDY *et al.*, 2003) e como próteses e enxertos de tecidos humanos e veterinários (REHM e REED, 1988; GALEGO *et al.*, 2000). Estudos realizados por Savenkova *et al.* (2000), para uso de P(3HB) como uma matriz polimérica biodegradável contendo pesticidas, revelaram sua eficiência para o fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea* sem, contudo, afetar os microrganismos totais naturais do solo.

Os bioplásticos têm sido produzidos em escala industrial por culturas de microrganismos desde a década de 70. Têm sido utilizados comercialmente como embalagens plásticas. No entanto, o custo de produção dos PHAs ainda é muito alto comparado aos plásticos convencionais, o que limita suas aplicações em certos mercados.

### 1.9 Degradação de polímeros

Degradação é qualquer reação química destrutiva dos polímeros, que pode ser causada por agentes físicos e/ou químicos. A degradação causa uma modificação irreversível nas propriedades

dos materiais poliméricos, sendo evidenciada pela deterioração progressiva dessas propriedades, incluindo o aspecto macroscópico dos polímeros (AGNELI, 2000; GUILLET *et al.*, 1992).

Quando aplicado a sistemas poliméricos convencionais, o conceito de degradação é mais amplo e pode até abranger efeitos físicos que conduzirão à perda de função do produto polimérico. Nesse caso, as reações de degradação são indesejáveis, isto é, para o polímero convencional procura-se uma alta durabilidade, ou vida útil elevada, pela aplicação adequada de sistemas poliméricos onde normalmente se inclui o uso de formulação com o correto emprego de aditivos antidegradantes específicos (KELEN, 1983). Fios e cabos enterrados e tintas para pintura de construção ou de embarcações sofrem adição de fungicidas e bactericidas de forma a se obter elevada durabilidade pela resistência à degradação biológica (REICH e STIVA, 1971).

As reações de degradação são benéficas para os casos de rejeitos poliméricos não-recicláveis, por contaminação ou por inviabilidade econômica, entre os quais estão os sacos de lixo e outros produtos descartáveis, tais como sacolas, fraldas e embalagens de curta duração. Além desses exemplos, existem inúmeras situações em que reações controladas de degradação são utilizadas de forma vantajosa para modificar diferentes características dos sistemas poliméricos (KELEN, 1983). De acordo com Kelen (1983), os tipos de degradação são geralmente analisados pelos aspectos descritos a seguir.

#### ***Em relação à severidade da degradação***

- Superficial: altera o aspecto visual do material polimérico e, principalmente, a sua cor;
- Estrutural: altera as propriedades mecânicas, térmicas, elétricas etc. e compromete o desempenho estrutural do material polimérico.

#### ***Em relação aos mecanismos gerais das reações de degradação***

- Degradação sem cisão da cadeia principal do polímero: em geral é uma degradação de nível superficial;
- Degradação com cisão da cadeia principal do polímero: pode causar uma redução drástica da massa molar das cadeias poliméricas, sendo em geral uma degradação de nível estrutural.

### *Em relação ao local de atuação dos agentes de degradação*

- Degradação causada pelo processamento do polímero;
- Degradação em condições de serviço: isto é, durante o uso do material polimérico;
- Degradação após o uso do material polimérico: caso ele tenha se transformado em resíduo não-reciclável.

### *Em relação aos agentes ou fatores causadores da degradação*

- Agentes físicos: radiação solar e outras radiações, temperatura e atrito mecânico intenso;
- Agentes químicos: água, ácidos, bases, solventes, outros produtos químicos, oxigênio, ozônio e outros poluentes atmosféricos;
- Agentes biológicos: microrganismos, tais como fungos e bactérias; as degradações biológicas são de natureza química, sendo os microrganismos os agentes desses ataques químicos.

#### *1.9.1 Biodegradação*

Em muitos países industrializados, a redução do volume de lixo tem sido um tema de intenso debate. Nesse contexto, os polímeros biodegradáveis estão sendo utilizados para auxiliar na redução do percentual de lixo polimérico. Esses materiais, além das características similares aos polímeros petroquímicos, têm ainda a vantagem de serem produzidos por meio de fontes renováveis e contribuir para a ciclagem de materiais de modo análogo aos ciclos biogeoquímicos da natureza (BRANDL *et al.*, 1995).

A biodegradação ou degradação biológica compreende as alterações de sistemas poliméricos pelo ataque destrutivo de microrganismos, tais como fungos e bactérias (REICH e STIVA, 1971).

Na natureza, os polímeros são degradados preferencialmente por reações hidrolíticas. A presença de éster, éter ou ligações amida facilita a degradação biológica. Os PHAs podem ser degradados tanto intracelularmente, por meio de despolimerases intracelulares, como

extracelularmente. No entanto, a taxa de degradação intracelular de P(3HB) é cerca de 10 vezes menor do que sua taxa de síntese (SUDESH *et al.*, 2000).

Despolimerases extracelulares são secretadas por muitas bactérias para utilização de PHA liberado no ambiente depois da morte das bactérias produtoras. Despolimerases extracelulares não são capazes de hidrolisar grânulos intracelulares e despolimerases intracelulares não são capazes de hidrolisar P(3HB) extracelular. Isso aparentemente acontece em decorrência das diferenças nas estruturas físicas dos grânulos intracelulares e extracelulares. Estes últimos são polímeros altamente cristalinos, enquanto os grânulos intracelulares são estruturas amorfas, cuja superfície é recoberta por uma camada composta de proteínas e fosfolipídios. Essa camada protetora é perdida ou danificada quando do isolamento dos grânulos por tratamentos com solventes químicos ou qualquer outro estresse físico (JENDROSSEK *et al.*, 1996).

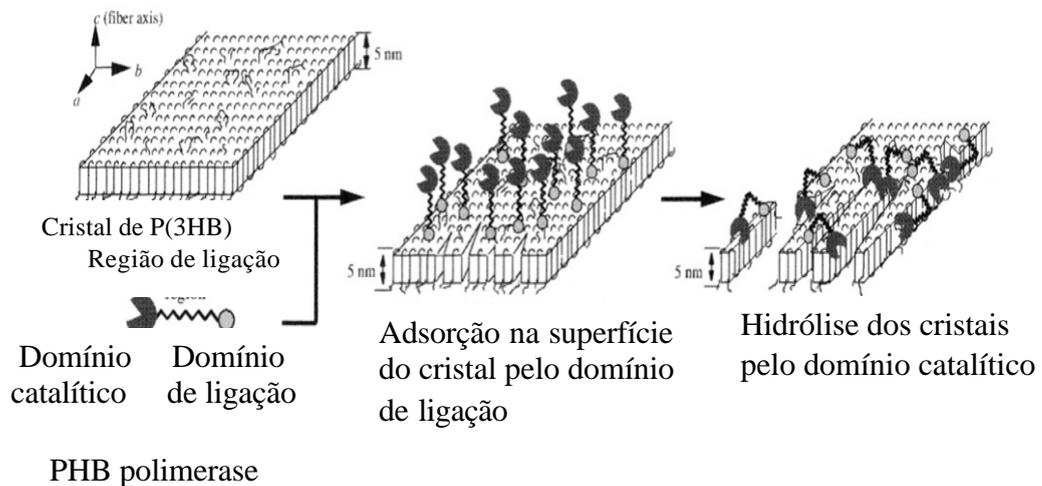
Foi demonstrado que em culturas líquidas de microrganismos, os mesmos secretam enzimas que degradam preferencialmente a parte amorfa do polímero em vez da parte cristalina. As estruturas altamente ordenadas e a morfologia das amostras afetam não apenas a reação de degradação como também a colonização das bactérias na superfície (NISHIDA e TOKIWA, 1993).

PHA-despolimerases extracelulares são divididas em duas classes com base em sua especificidade pelo substrato. Um grupo contém SCL-PHA-despolimerase, que degrada apenas P(3HB) e seus copoliésteres contendo 3HV ou 4HB. O outro grupo é composto por MLC-PHA-despolimerases, que primeiramente decompõem os PHAs alifáticos e aromáticos consistindo de 3-hidroxicanoatos de C6–C14. A grande maioria dos microrganismos degradadores de PHA é conhecida por produzir apenas um tipo de PHA-polimerase, que age segundo um modelo ou o outro (KIM e RHEE, 2003).

As propriedades de uma despolimerase P(3HB) extracelular de *Alcaligenes faecalis* têm sido intensamente estudadas. A hidrólise enzimática de P(3HB) por essa P(3HB)-despolimerase fornece, como produto principal, dímeros de HB e, em menor extensão, monômeros de HB. A hidrólise dos oligômeros em 3-hidroxibutirato pela P(3HB)-despolimerase mostra que a enzima

cliva principalmente a segunda e a terceira ligação éster a partir do terminal hidroxil. No entanto, uma vez que a enzima também cliva oligômeros cíclicos, a P(3HB)-polimerase de *A. faecalis* possui uma atividade endo-hidrolase em adição à atividade exo-hidrolase. Estudos recentes demonstraram que o sítio ativo da P(3HB)-despolimerase reconhece a seqüência de quatro unidades monoméricas como substrato para hidrólise de ligações éster em uma cadeia polimérica (SUDESH *et al.*, 2000).

Um modelo esquemático para hidrólise enzimática das ligações éster na cadeia polimérica (PHA) pela PHB-despolimerase de *A. faecalis* foi proposto por Abe *et al.* (1995) (*apud* SUDESH *et al.*, 2000), conforme mostrado na figura 1.8.



**Figura 1.8** Modelo esquemático para hidrólise enzimática de uma ligação éster em várias seqüências pela PHB extracelular despolimerase. (SUDESH *et al.*, 2000)

A degradação é influenciada por uma série de parâmetros ambientais, físico-químicos e microbiológicos do ambiente (tabela 1.5). As propriedades primárias dos materiais e seu processamento também têm efeito sobre o grau de biodegradação (BRANDL *et al.*, 1995).

Segundo Jendrossek e colaboradores (1996), os fatores físico-químicos mais importantes que influenciam a biodegradação do polímero são: (1) a estereo-regularidade do polímero: apenas as ligações éster dos monômeros na configuração (R) são hidrolisadas pelas despolimerases; (2) a cristalinidade do polímero: a degradabilidade do poliéster diminui à medida que a cristalinidade global ou a perfeição da fase cristalina aumenta; (3) a massa molar do polímero: polímeros de baixa massa molar são geralmente degradados mais rapidamente do que poliésteres de alta massa molar; (4) a composição monomérica do

polímero: a taxa de decomposição do P(3HB) é menor do que para o seu copolímero P(3HB)-*co*-(3HV).

**Tabela 1.5** Fatores que influenciam a degradação dos polímeros biodegradáveis

Parâmetro	Fator
Características físico-químicas de um ecossistema	Temperatura pH Quantidade de água Quantidade de oxigênio Potencial redox Suplemento nutricional Presença de inibidores
Diversidade microbológica de um ecossistema	Densidade populacional Diversidade microbológica Atividade microbológica Distribuição espacial de microrganismos Habilidade de adaptação
Propriedades primárias do material	Composição polimérica Massa molar Distribuição de massa molar Grau de cristalinidade Temperatura de transição vítrea Porosidade Hidrofobicidade Tipo de ligações entre os monômeros
Processamento do material	Tipo de processamento Características da superfície Espessura do material Aditivos Revestimento

Fonte: BRANDL *et al.* (1995)

Um grande número de microrganismos aeróbios e anaeróbios tem sido isolado em diversos ambientes (aquáticos e terrestres), como *Acidovorax facilis*, *Aspergillus fumigatus*, *Comamonas* sp, *Pseudomonas lemoignei* e *Variovorax paradoxus*, do solo; *Alcaligenes faecalis* e *Pseudomonas fluorescens*, de lodo ativado; *Comamonas testosteroni*, da água do mar; *Pseudomonas stutzeri*, em lagos de água doce; e *Ilyobacter delafieldii*, de lodo anaeróbio. Esses microrganismos excretam uma PHA-despolimerase que degrada PHAs em monômeros solúveis, em água e oligômeros, utilizando-os como fonte de carbono. Os produtos finais da degradação aeróbia do P(3HB) são água e dióxido de carbono, enquanto na degradação anaeróbia também é produzido metano (LEE, 1996b; JENDROSSEK *et al.*, 1996).

A habilidade de degradar PHA não é restrita às bactérias, e muitos gêneros de fungos têm sido identificados: *Ascomycetos*, *Basidiomycetos*, *Deuteromycetos*, *Mastigiomy*, *Myscomycetos*, *Zygomycetos* (JENDROSSEK *et al.*, 1996).

A American Society for Testing Materials (ASTM) tem proposto vários métodos de análise e acompanhamento da biodegradação de polímeros. Dentre eles, pode-se citar o guia para avaliação da compostabilidade de plásticos ambientalmente degradáveis (ASTM D 6002-96), o método para determinação da biodegradação aeróbia de materiais plásticos sensíveis à radiação sob condições controladas de compostagem (ASTM D 5338-98) e os métodos para determinação da biodegradação de materiais plásticos em água ou ambiente compostado (ASTM D 6340-98). Entretanto, tem se destacado a norma para a determinação da biodegradação aeróbia dos plásticos e exposição dos plásticos em um ambiente simulado de solo (ASTM D 6400-99), que inclui as normas anteriores. Alguns desses métodos de análise de biodegradação aeróbia são baseados no teste de Sturm (ROSA *et al.*, 1999).

O teste de Sturm avalia a biodegradabilidade de um polímero em meio microbiano ativo em condições aeróbias, avaliando a porcentagem de CO<sub>2</sub> liberado. A produção de CO<sub>2</sub> em função do tempo constitui uma fase, mas não a única, para obtenção de informações sobre a biodegradação do polímero. Dentre os meios propostos como inoculantes para a avaliação da biodegradação de polímeros encontram-se o lodo ativado, o solo compostado, o composto orgânico, entre outros (ROSA *et al.*, 2002).

O teste da garrafa fechada utiliza uma quantidade pré-determinada de substância teste que é adicionada a uma solução salina mineral quimicamente definida. Essa solução é inoculada com microrganismos oriundos de esgoto em garrafas fechadas (CHANDRA *et al.*, 1998).

A leitura em placa de Petri consiste em colocar a substância teste (considerada fonte de carbono) na superfície do meio contendo ágar. O inóculo é adicionado à placa, sendo

esta então fechada e incubada sob temperatura constante durante 21 e 28 dias (CHANDRA *et al.*, 1998).

No teste de degradação em solo, o material a ser estudado é enterrado em recipientes com solo preparado em laboratório (conforme norma ASTM G 160-98), constituído de areia, esterco e terra adubada. O solo é acondicionado por várias semanas antes do uso, de forma a aumentar a atividade microbiana. Em seguida, as amostras são enterradas no solo, e é feito o acompanhamento da degradação por várias técnicas de caracterização de polímeros (VOGELSANGER *et al.*, 2003). Dentre elas, destacam-se a análise termogravimétrica (TGA), muito utilizada para caracterização do perfil de degradação de polímeros. A TGA baseia-se no estudo da variação de massa de uma amostra, resultante da transformação física – como sublimação, evaporação, condensação – ou química – como degradação, decomposição, oxidação em função da temperatura. Em outras palavras, a TGA pode ser definida como um processo contínuo que mede a variação da massa (perda ou ganho) de uma substância ou material como uma função da temperatura. A curva de degradação térmica, em condições isotérmicas, mostra o perfil da resistência ou estabilidade térmica que o material apresenta quando submetido a uma varredura de temperatura. A estabilidade térmica é definida como a capacidade do material de manter suas propriedades o mais próximo possível de suas características iniciais (SPIER, 2005).

A utilização de técnicas de análise térmica, como DSC e TGA, auxilia na observação das alterações nas propriedades do material antes e depois da degradação. A caracterização das propriedades térmicas, como grau de cristalinidade obtido por meio da entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ) e temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), é obtida por DSC. A análise termogravimétrica (TGA) fornece as temperaturas de início de degradação ( $T_i$ ) e temperatura máxima de degradação ( $T_{pico}$ ), onde é possível avaliar a degradação térmica e a perda de massa dos polímeros.

O estudo da biodegradação em lodo ativado de misturas de PCL/amido, PHBV/amido e P(3HB)/amido mostrou que o P(3HB) puro foi o polímero que apresentou maior taxa de degradação. Com o aumento da porcentagem de amido no PCL e PHBV, observou-se um aumento da taxa de degradação dos mesmos determinada a partir do teste de Sturm em solo compostado (ROSA *et al.*, 2000). Uma comparação da biodegradação de P(3HB), PHBV e PCL, em solo compostado a 58°C, mostrou que o P(3HB) foi o polímero que mais biodegradou, e não foi percebida uma grande produção de CO<sub>2</sub> para o PHBV, enquanto a PCL foi o polímero que apresentou a taxa de biodegradação mais lenta (PANTANO FILHO *et al.*, 2003).

Kim *et al.* (2000) caracterizaram o comportamento da degradação de três polímeros comerciais biodegradáveis: P(3HB), Sky-Green (SG) – poliéster alifático biodegradável – e Mater-Bi (MB) – um compósito à base de amido –, incubados em solo de floresta, em solo de areia, em lodo ativado e em solo de fazenda, nas temperaturas de 28°C, 37°C e 60°C. Tanto SG quanto MB mostraram maior degradabilidade a 28°C, enquanto a biodegradabilidade do P(3HB) foi maior a 37°C. A 60°C em solo com lodo ativado, os filmes de P(3HB) degradaram apenas 30,5%, resultado muito inferior quando comparado aos 98% de perda de massa às temperaturas de 28°C e 37°C em 25 dias. O lodo ativado se mostrou mais apropriado, possibilitando as maiores perdas mássicas. Por outro lado, no solo de floresta e no solo arenoso a perda de massa foi menor do que 10% no mesmo tempo de degradação. A ordem da taxa de biodegradação foi PHB > SG > MB.

A biodegradação de 3-HB e 4-HB produzidos por *Alcaligenes eutrophus* (*Ralstonia eutropha*, atualmente *Cupriavidus necator*) foi verificada por Kunioka e colaboradores (1989). Os ensaios foram conduzidos em solo e lodo ativado, e a taxa de biodegradação no solo a 20–25°C após seis semanas apresentou a seguinte ordem:

$$P(3HB - co - 9\% 4HB) > P(3HB) \approx P(3HB - co - 50\% 3HV)$$

Em adição, as amostras mantidas a 30°C sob aeração no lodo ativado, obtido de uma estação de tratamento de esgoto, já se apresentavam em estado avançado de decomposição em duas semanas. O polímero contendo fração de 4HB sofreu o processo de decomposição mais acelerado (KUNIOKA *et al.*, 1989).

À luz dos estudos realizados, o presente trabalho tratará da biosíntese de P(3HB) por *Ralstonia eutropha* avaliando a suplementação de ácido oléico, da extração do polímero visando à formação do filme e sua posterior caracterização, bem como a sua biodegradação em solo. Por fim, visando melhorar as propriedades físicas do P(3HB), este trabalho abordará também o preparo de blendas de P(3HB)/PCL, assim como a avaliação de sua miscibilidade, e biodegradação em solo.

*Cada fracasso nos ensina algo que necessitávamos aprender.*

(Charles Dickens)

## Capítulo 2 - MATERIAL E MÉTODOS

---

O capítulo 2 descreve todas as técnicas analíticas utilizadas no desenvolvimento deste trabalho para obtenção dos dados experimentais. A metodologia utilizada nos cálculos também é apresentada para o entendimento dos valores calculados.

## 2.1 Microrganismo

*O microrganismo utilizado neste trabalho foi a bactéria mutante **Ralstonia eutropha** – DSM 545 (Cupriavidus necator), conforme definição recente proposta pela Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Coleção de Microrganismos e Cultura de Células da Alemanha) ([www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)), cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Para sua manutenção, foi empregado o cultivo em tubos de ensaio contendo meio sólido (ágar nutriente), com repiques mensais. Essa cultura foi mantida a 30°C durante 48 horas, e a seguir armazenada em refrigerador a 4°C. A composição do meio ágar nutriente utilizado foi de 5,0g/L de peptona de carne, 3,0g/L de extrato de carne e 1,5g/L de ágar.*

### 2.1.1 Meios de cultivo

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

O meio de cultivo utilizado para as culturas foi formulado segundo Aragão (1996) e denominado meio mineral (MM). A sua composição está demonstrada nas tabelas 2.1 e 2.2. Nos estudos realizados com ácido oléico como suplemento nutricional, o meio foi acrescido do ácido graxo nas seguintes concentrações: 0, 0,3, 0,9, 1,5 e 3,0g/L. Nos estudos realizados com óleo vegetal como suplemento nutricional, o meio foi acrescido do óleo vegetal (canola) com elevado teor de

ácido oléico (75%), observando-se a concentração equivalente a 3,0g/L em ácido oléico.

**Tabela 2.1** Composição do meio mineral (MM)

	Componente	A Concentração da sol estoque (g/L)	B Volume (mL) <sup>a</sup>	C Concentração final (g/L)
SOLUÇÃO 1	ácido nitriloacético (NTA)	19,1	10	0,19
	citrato férrico de amônia	10	6	0,06
	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	50	10	0,5
	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	5	2	0,01
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200	25	5,0 <sup>e</sup>
	solução de oligoelementos <sup>b</sup>		1	
	água destilada <sup>c</sup>			
SOLUÇÃO 2 <sup>f</sup>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 12H <sub>2</sub> O	223,8	40	8,95
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	37,5	40	1,5
SOLUÇÃO 3	fonte de carbono <sup>d</sup>			30

<sup>a</sup> Volume retirado da solução-estoque para o meio de cultura.

<sup>b</sup> A composição da solução de oligoelementos é demonstrada na tabela 2.2.

<sup>c</sup> O volume de água foi calculado em função das concentrações das soluções da coluna B.

<sup>d</sup> A fonte de carbono (glicose + frutose) foi adicionada diretamente ao meio, não sendo armazenada solução-estoque.

<sup>e</sup> A concentração da fonte de nitrogênio citada neste caso foi para ensaios sem limitação de nitrogênio.

<sup>f</sup> A concentração da fonte de fósforo citada neste caso foi para ensaios sem limitação de fósforo.

**Tabela 2.2** Composição da solução de oligoelementos

Elemento	Concentração (g/L)	Elemento	Concentração (g/L)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,3	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,03
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,2	NiCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,02
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,1	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,01
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	0,03		

Fonte: Aragão (1996)

Cada uma das substâncias da tabela 2.1 foi pesada separadamente, preparando-se frascos contendo soluções-estoque (coluna A). Em seguida, cada constituinte das soluções 1 e 2 foi autoclavado separadamente, a 121°C por 20 min, sendo depois mantidas em refrigerador a 4°C até o uso. Para a preparação do meio de cultivo, foram preparadas as soluções 1, 2, 3 utilizando-se as soluções-estoque com concentração definida na coluna A, nos volumes definidos na coluna B. O pH da solução 1 foi ajustado a 7,0 com NaOH (30%) – 7,5M ou

HCl (40%), 11M. As três soluções foram preparadas novamente e autoclavadas durante 20 minutos a 121°C.

## 2.2 Condições de cultivo

### 2.2.1 Culturas iniciais

As células foram ativadas em frascos de Erlenmeyer aletados (500mL) contendo 100mL de meio NB, sendo incubadas em *shaker* com movimento rotatório a 30°C, 150min<sup>-1</sup> por 12h (pré-inóculo). Após esse período, a cultura foi transferida para o meio MM, em uma fração de inóculo de 10% (V/V). O cultivo para preparo do inóculo foi conduzido em frascos de Erlenmeyer aletados (1.000mL), contendo 300mL de meio MM sem limitação de nitrogênio e agitados por 24h, a 150min<sup>-1</sup> e 30°C.

### 2.2.2 Ensaios realizados em frascos agitados

As células de *Ralstonia eutropha* foram cultivadas em frascos de Erlenmeyer (1.000mL) aletados, contendo 300mL de meio mineral, tendo como fonte de carbono açúcar invertido (glicose e frutose) (30g/L) e como fonte de nitrogênio sulfato de amônio na concentração de 5,0g/L para condições sem limitação de nitrogênio e 2,3g/L para condições com limitação desse nutriente. As culturas (feitas em duplicata) foram mantidas sob agitação de 150min<sup>-1</sup>, nas temperaturas de 30 e 37°C (conforme experimento), durante 24 horas.

Para verificar a influência do ácido oléico sobre o crescimento celular, o ácido graxo em concentrações variando de 0 a 3,0g/L foi adicionado no início do cultivo e, nos ensaios para verificação da influência do ácido oléico sobre a produção do polímero, a adição foi feita somente no início da fase estacionária. A determinação do final da fase exponencial e início de fase estacionária foi feita com base no acompanhamento da absorbância. O pH do meio de cultura foi corrigido durante a cultura para 7,0, quando necessário, mediante a adição de ácido ou base.

### 2.2.3 Ensaio realizados em biorreator

Os ensaios conduzidos em biorreator (figura 2.1) tiveram a composição do MM conforme descrito na tabela 2.1.

O biorreator utilizado (MD – Braun) com cuba 5L (volume útil igual a 4L) foi autoclavado por 20min a 121°C, contendo a solução 1 (tabela 2.1). Após o processo de esterilização, foram adicionadas as soluções 2 e 3, previamente esterilizadas, de forma a atender as concentrações previstas na tabela 2.1, exceto para a substância sulfato de amônio, cuja concentração foi de 2,3g/L para condições com limitação em nitrogênio.

O inóculo foi adicionado na quantidade equivalente a 10% do volume final de meio no biorreator. Os parâmetros para condução do processo foram: 30°C e/ou 37°C (conforme experimento) – tabela 2.3, pH 7,0 (controlado com NaOH (30%), 7,5M, ou HCl (40%), 11M).

As condições de agitação e aeração variaram de 400min<sup>-1</sup> a 780min<sup>-1</sup> e 0,12vvm a 1vvm, respectivamente, de forma que a pressão parcial de oxigênio dissolvido (pO<sub>2</sub>) não ficasse abaixo de 20%. Como antiespumante foi utilizado polipropilenoglicol 2000 (Fluka).

A limitação do nitrogênio vai ocorrendo naturalmente nas culturas em decorrência do crescimento celular. A determinação da fase de crescimento foi feita com base na dosagem do nitrogênio (item 2.3.5). O final da fase de crescimento e portanto, início da fase de produção do polímero, foi definido no momento em que houve exaustão de nitrogênio.

**Tabela 2.3.** Resumo das condições de cultivo utilizadas em biorreator

Condição	Fase	Temperatura (°C)	Suplementação com ácido oleico (AO)(g/L)
BT1	crescimento	30°C	-
	produção	30°C	-
BT2	crescimento	37°C	-
	produção	37°C	-
BT3	crescimento	30°C	-
	produção	37°C	-
BT4	crescimento	30°C	3,0
	produção	37°C	-
BT5	crescimento	30°C	3,0
	produção	37°C	3,0
BT6	crescimento	30°C	óleo de canola (3,0 g/L equivalente em AO)
	produção	37°C	óleo de canola (3,0 g/L equivalente em AO)



**Figura 2.1.** Dispositivo experimental de cultivo em biorreator

#### 2.2.3.1 Estratégia de alimentação

a) **Alimentação em açúcar:** sempre que a concentração de substrato se aproximava de 10g/L, era realizado um pulso a partir de uma solução a 500g/L, de forma a permitir que a concentração de açúcar no meio retornasse ao valor inicial, igual a 30g/L. O consumo de substrato foi monitorado por meio do método de DNS (item 2.3.4).

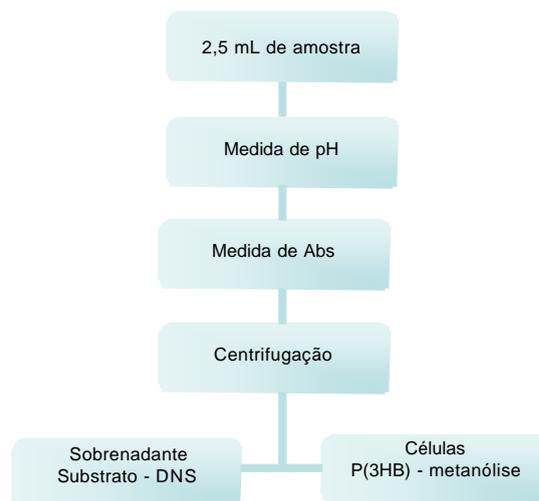
b) *Pulso de ácido oléico*: para verificar a influência do ácido oléico sobre as fases de crescimento microbiano ou de produção de P(3HB), foi adicionado ácido oléico na concentração de 3,0g/L no início do cultivo ou no início da fase de produção.

## 2.3 Técnicas analíticas para acompanhamento do cultivo

### 2.3.1 Processamento das amostras

#### 2.3.1.1 Ensaio em frascos agitados

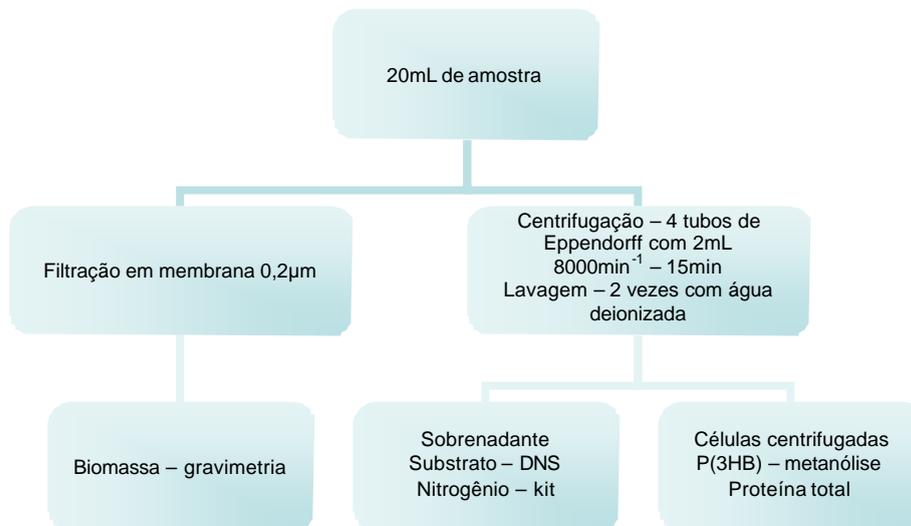
Foram retiradas alíquotas de 2,5mL a cada 1,5 ou 2 horas para determinação da absorbância (Abs), do pH (corrigido para 7,0, se necessário), da síntese de P(3HB) e do consumo de substrato, conforme figura 2.2.



**Figura 2.2** Fluxograma do processamento das amostras para os ensaios conduzidos em frascos de Erlenmeyer

#### 2.3.1.2 Ensaio em biorreator

Alíquotas de 20mL foram retiradas em intervalos de 2 horas para determinação das concentrações de biomassa (gravimetria), P(3HB), nitrogênio, proteína total e consumo de substrato (figura 2.3).



**Figura 2.3** Fluxograma do processamento das amostras para os ensaios conduzidos em biorreator

### 2.3.2 Biomassa

A biomassa foi medida por turbidimetria (ensaios conduzidos em frascos de Erlenmeyer) e por gravimetria (ensaios conduzidos em biorreator). Leituras de absorbância das suspensões de células provenientes dos cultivos foram realizadas em um espectrofotômetro (LKB Biochron – Novaspec II), a 600nm, e convertidas em concentração celular (g/L) por meio de uma curva de correlação. A aplicação da curva de correlação só é possível para células que se encontravam na fase exponencial de crescimento, em função de alteração morfológica.

Para a construção da curva de correlação entre a absorbância e a concentração celular, células de *Ralstonia eutropha* DSM 545 foram cultivadas em meio mineral (MM). Após atingir uma absorbância de aproximadamente 2, a suspensão sofreu várias diluições. Cerca de 7mL da suspensão de células provenientes do mesmo cultivo foram filtrados a vácuo, em membranas de poliamida (0,2µm) previamente secas e pesadas. Após a filtração, as membranas foram novamente secas até peso constante (24h a 90°C). A massa resultante da diferença de peso das membranas com e sem células foi dividida pelo volume filtrado e a curva (anexo 1 – figura A.1) foi construída correlacionando-se a absorbância com a

concentração celular (g/L). A equação matemática obtida (2.1) utilizada apresenta um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) igual a 0,9939:

$$X = \frac{(abs - 0,1255)}{1,85} \text{ (equação 2.1)}$$

Onde:

X = concentração de células (g/L)

Abs = absorvância da suspensão

### 2.3.3 Determinação da concentração de P(3HB) (metanólise)

***Um volume de 2mL de meio foi centrifugado e as células lavadas duas vezes com água deionizada, sendo depois congeladas e posteriormente submetidas à metanólise, conforme o método baseado em Braunegg et al. (1988), com as modificações propostas por Brandl et al. (1988). Em seguida, o P(3HB) foi dosado por cromatografia gasosa.***

Para elaboração da curva padrão, o polímero puro (Aldrich) foi pesado de forma a se obter massas entre 0,001 e 0,05g. Uma curva típica pode ser visualizada no anexo 1 – figura A.2. Os padrões foram submetidos à etapa de metanólise, bem como as amostras.

#### ***Metanólise***

Foram acrescentados 2mL de metanol acidificado e 2mL de clorofórmio sobre as células; os tubos de ensaio foram muito bem fechados (utilizou-se fita veda-rosca) e novamente suspensos no vórtex. Em seguida, os tubos foram levados ao banho termostático, com tampa, a 100°C, durante 1 hora.

Decorrido esse tempo, os tubos foram retirados um a um e agitados no vórtex, voltando ao banho por mais 1h20 min. Finalmente, os tubos foram retirados do banho quente e levados a um banho de gelo.

Após o abaixamento da temperatura até a temperatura ambiente, acrescentou-se 1mL de água destilada agitando-se novamente no vórtex por 30 segundos para a formação de duas fases. Com uma pipeta Pasteur, retirou-se a fase inferior (clorofórmio mais polímero) passando-a aos *viels* para a análise por cromatografia gasosa.

### ***Cromatografia gasosa***

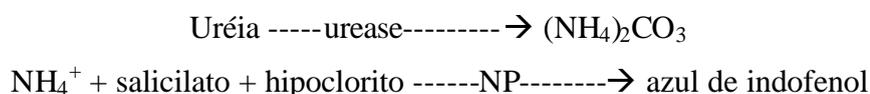
A coluna utilizada para a dosagem de P(3HB) foi de sílica fundida ( $\emptyset$  0.53mm/30m) modelo Supercowax 10. O cromatógrafo usado foi um CG–System 6890 marca Agilent equipado com um detector de ionização de chama (FID – hidrogênio e oxigênio), utilizando hélio como gás de arraste com fluxo constante de 3,5mL/min; temperaturas de injeção e detecção foram de 250°C com temperatura da coluna aumentando em rampa, de 80°C a 200°C (20°C/min).

#### *2.3.4 Determinação da concentração de substrato*

A determinação da concentração de substrato foi realizada com base no método do ácido 3-5-dinitrossalicílico DNS (MILLER, 1959). As amostras coletadas foram diluídas adequadamente de forma que a concentração de substrato se situasse entre os valores da curva padrão, cujas concentrações variaram de 0 a 2g/L de glicose e frutose (anexo 1 – figura A.3). A 1mL dessa suspensão foi acrescentado 1mL de reagente de DNS e ela foi submetida a um tratamento térmico em banho de água a 100°C por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados em banho de gelo e acrescidos de 10mL de água deionizada. A absorbância foi lida a 540nm em espectrofotômetro LKB Biochron – Novaspec II.

### 2.3.5 Determinação do teor de nitrogênio

Para verificação do consumo de nitrogênio foi utilizado o *kit* Uréia ES, baseado no método enzimático-colorimétrico Berthlot, para determinar a uréia no soro, no plasma e na urina. Nesse método, a uréia é transformada em carbonato de amônia na presença de urease. O íon amônio, na presença de salicilato, hipoclorito e nitroprussiato (NP), forma azul de indofenol, conforme esquema a seguir, produto cuja intensidade da cor formada é diretamente proporcional à concentração de uréia na amostra.



#### Reativos do kit

- Reativo 1: 100mL de solução-tampão fosfato 0,1M, salicilato 0,3M, nitroprussiato de sódio 17mM e EDTA 7mM
- Reativo 2: 17mL de hipoclorito de sódio 0,32M em NaOH 4,0M
- Reativo 3: 20mL de solução de urease em tampão fosfato
- Reativo 4: solução padrão – 5mL de solução aquosa de uréia 60mg/dL
- Reativo 1 A: mistura de 5 partes do reativo 1 com 0,2 parte de reativo 3

O preparo das amostras (devidamente diluídas), assim como das soluções padrão e branco, foi realizado de acordo com a tabela 2.3.

**Tabela 2.4** Volumes de água, amostra e reagentes utilizados na dosagem de nitrogênio

	<b>Branco</b>	<b>Padrão</b>	<b>Amostra</b>
Padrão	---	10µL	---
Amostra	---	---	10µL
Reativo 1A	1mL	1mL	1mL
Misturar. Incubar exatamente 5 min a 37°C. Adicionar:			
Reativo nº2	1mL	1mL	1mL
Misturar. Incubar exatamente 5 min a 37°C.			

A leitura da absorbância foi realizada a 600nm em espectrofotômetro LKB Biochron – Novaspec II, zerando-se o aparelho com o branco. A reação é estável por até duas horas e a concentração de uréia foi calculada segundo a equação 2.2:

$$Uréia(mg / dL) = \frac{amostra}{padrão} \times 60 \text{ (equação 2.2)}$$

### 2.3.6 Determinação do teor de proteína

As células previamente centrifugadas foram ressuspensas em 5,5mL de água destilada, ocorrendo a lise celular pela adição de 1mL de NaOH 20% (m/V) ou 5M e incubadas em banho-maria a 100°C por 5min. Em seguida, foram adicionados 170µL de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 25% (m/V) à suspensão, que foi homogeneizada em vórtex e deixada em repouso por 5 min. A solução foi centrifugada a 5.000rpm por 10 min e o sobrenadante formado foi analisado por espectrofotometria a 560nm. A curva padrão (anexo 1 – figura A.4) utilizou albumina bovina (BSA) entre 0 e 3g/L.

## 2.4 Metodologia utilizada nos cálculos

Considerando-se que o acúmulo de P(3HB) é intracelular, é importante a definição dos termos a seguir, para melhor entendimento da metodologia adotada para os cálculos:

$$X_t(\text{biomassa total}) = \text{biomassa contendo P(3HB) intracelular}$$

$$X_r(\text{biomassa residual}) = X_t - \text{P(3HB) intracelular}$$

### 2.4.1 Fatores de conversão

- Fator de conversão de substrato em produto

$$Y_{P(3HB)/S} = \frac{(P(3HB)_k - P(3HB)_0)}{(S_{\text{Consumido}})} \text{ (equação 2.3)}$$

- Fator de conversão de substrato em células

$$Y_{Xr/S} = \frac{(Xr_k - Xr_0)}{(S_{\text{consumido}})} \text{ (equação 2.4)}$$

Onde:

$X_{rk}$ ,  $P(3HB)_k$ : valores de concentração celular (g/L) e concentração em P(3HB) (g/L), respectivamente, no tempo K.

$X_0$  e  $P(3HB)_0$ : valores iniciais (em relação à fase considerada) de concentração celular (g/L) e concentração de P(3HB) (g/L), respectivamente.

$S_{consumido}$ : quantidade de substrato consumido no período considerado (g/L).

Os valores correspondentes ao fator de conversão de substrato em células e/ou polímero expressos em Cmol (mol da substância quando se tem 1 carbono na molécula) foram determinados considerando os seguintes valores:

- Cmol células na fase de crescimento:  $C H_{1,77} O_{0,44} N_{0,25} S_{0,014} P_{0,0076} \rightarrow 24,99g$
- Cmol células na fase de produção:  $C H_{1,61} O_{0,44} N_{0,14} S_{0,077} P_{0,01} \rightarrow 25,89g$
- Cmol glicose/frutose:  $C_6 H_{12} O_6 \rightarrow CH_2O \rightarrow 30g$
- Cmol ácido oléico:  $C_{18} H_{34} O_2 \rightarrow CH_{1,88} O_{0,11} \rightarrow 15,6g$
- Cmol P(3HB):  $C H_{1,5} O_{0,5} \rightarrow 21,5g$

#### 2.4.2 Produtividade

- Produtividade em P(3HB) ( $g.L^{-1}.h^{-1}$ )

$$P_{P(3HB)} = \frac{(P(3HB)_k - P(3HB)_0)}{(t_k - t_0)} \quad (\text{equação 2.5})$$

- Produtividade em células ( $g.L^{-1}.h^{-1}$ )

$$P_{Xr} = \frac{(Xr_k - Xr_0)}{(t_k - t_0)} \quad (\text{equação 2.6})$$

Onde:

$t_k$  = tempo de fermentação (h) correspondente a  $P(3HB)_k$  ou a  $X_{rk}$

$t_0$  = tempo inicial (h) do período considerado

#### 2.4.3 Velocidades específicas de crescimento celular, formação de produto e consumo de substrato

A partir dos perfis de concentração celular, formação de produto e consumo de substrato com o tempo, foi possível determinar, em cada instante, as velocidades instantâneas

de crescimento microbiano ( $dX/dt$ ), de formação de produto ( $dP(3HB)/dt$ ) e de consumo de substrato ( $dS/dt$ ).

Dividindo-se as velocidades instantâneas pela concentração celular residual no ponto, obtêm-se as velocidades específicas de crescimento celular ( $\mu_{xr}$ ), formação de produto ( $\mu_p$ ) e de consumo de substrato ( $\mu_s$ ).

$$\mu_{xr} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \text{ (equação 2.7)}$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \text{ (equação 2.8)}$$

$$\mu_s = \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \text{ (equação 2.9)}$$

A velocidade específica máxima de crescimento foi calculada por meio do coeficiente angular da reta obtida relacionando-se o logaritmo neperiano da massa celular ( $X$ ) com o tempo, de acordo com a equação 2.10.

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu t \text{ (equação 2.10)}$$

## 2.5 Recuperação do P(3HB) produzido

### 2.5.1 Extração de P(3HB)

A extração de P(3HB) foi realizada usando-se um novo método adaptado por Formolo *et al.* (2005), com base em Schneider *et al.* (2001). Ao término de cada ensaio, cerca de 150mL do meio foi congelado em frascos apropriados.

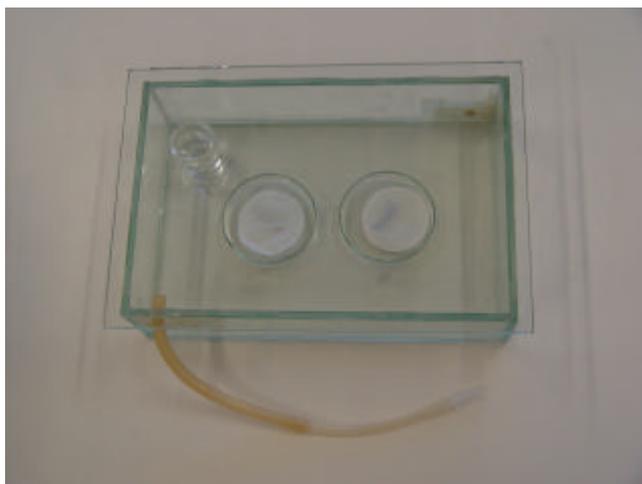
No momento da extração, o meio foi descongelado e homogeneizado, sendo retiradas alíquotas de 2mL, que foram transferidas para tubos de Eppendorff e centrifugadas a  $8.000\text{min}^{-1}$  por 15min. O sobrenadante foi descartado; as células foram lavadas duas vezes com água destilada e centrifugadas conforme mencionado.

Em seguida foram adicionados 1mL de clorofórmio e 1,25g de pérolas de vidro com 0,75mm de diâmetro. Os tubos de Eppendorff foram fechados, vedados com auxílio de fita crepe e levados ao moinho (Retsch) por 20 minutos em rotação máxima. Os tubos de Eppendorff foram novamente centrifugados a  $8.000 \text{ min}^{-1}$  por 15min. Houve formação de três camadas: a inferior composta pelas pérolas de vidro; a intermediária contendo clorofórmio e polímero dissolvido e a superior formada pelos rejeitos (*debris*) celulares. Com auxílio de uma pipeta automática, retirou-se a fase intermediária, que foi vertida em placas de Petri, as quais foram deixadas para secagem à temperatura ambiente.

### **2.5.2 Purificação (recristalização)**

Como o filme formado por esse processo ainda contém muitas impurezas, foi necessário um processo de purificação em n-hexano.

O polímero foi dissolvido em clorofórmio na razão de 1% m/V em recipiente fechado, sendo aquecido (máximo de 80°C) sob agitação magnética. Após a total dissolução, verteu-se essa solução em n-hexano na proporção de 1 : 2 (V : V), sem aquecimento, mas sob constante agitação. Imediatamente foram formados cristais poliméricos, recuperados por filtração a vácuo. O produto seco retido na membrana foi pesado novamente e dissolvido em clorofórmio na concentração de 0,1g/L, vertido sobre uma placa de Petri e deixado evaporar para formação do filme em uma cuba de vidro onde o solvente foi eliminado em atmosfera saturada de clorofórmio para evitar a separação de fases que pode ocorrer por ação da umidade (figura 2.4).



**Figura 2.4** Cuba de vidro para formação do filme por evaporação lenta de solvente

## 2.6. Caracterização do P(3HB) sintetizado por *Ralstonia eutropha*

O polímero obtido a partir dos cultivos de *Ralstonia eutropha* foi comparado ao P(3HB) fornecido pela PHB industrial (Lote FE-67 ESF), sendo caracterizado pelas técnicas de calorimetria diferencial exploratória (DSC), análise termogravimétrica (TGA), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e difratometria de raio-X.

### 2.6.1 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

As medidas no DSC foram feitas utilizando-se o equipamento TA Instruments para caracterizar o polímero quanto à temperatura de fusão ( $T_m$ ), temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) e grau de cristalinidade pela determinação da entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ). As amostras pesando de 7,2 a 7,8mg foram seladas em panelas de alumínio sob atmosfera inerte (argônio), aquecidas de 25 a 190°C com taxa de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup> e mantidas nessa temperatura por 2 minutos. Em seguida, foram resfriadas com taxa de 15°C min<sup>-1</sup> de 190 a -100°C e mantidas nessa temperatura por 2 minutos. Um segundo aquecimento foi

realizado no intervalo de temperatura de  $-100$  a  $190^{\circ}\text{C}$  com taxa de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ .

O grau de cristalinidade por esta técnica foi calculado da por meio da equação 2.11.

$$c_c = \frac{\Delta H_m - \Delta H_c}{\Delta H_m^0} \times 100\% \quad (\text{equação 2.11})$$

Onde:

$\Delta H_m$  = entalpia de fusão da amostra (J/g)

$\Delta H_c$  = entalpia de cristalização da amostra (J/g)

$\Delta H_m^0$  = entalpia de fusão considerando polímero 100% cristalino (J/g)

Para P(3HB)  $\Delta H_m^0 = 142$  (J/g)

### 2.6.2 Análise termogravimétrica (TGA)

Visando determinar a degradação térmica e a perda de massa (amostras degradadas) e determinar a estabilidade térmica dos polímeros (temperatura do início de degradação ( $T_i$ ) e temperatura máxima de degradação ( $T_{\text{pico}}$ ), foram realizadas análises de TGA em equipamento da Netzsch – Gerätebau GmbH Thermal Analysis Proteus. As amostras foram aquecidas de  $25$  a  $600^{\circ}\text{C}$  a uma taxa de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ , sob atmosfera de argônio. A determinação da temperatura máxima de degradação foi feita com base na 1ª derivada. O anexo 5 – figura A5.3 apresenta uma curva típica de termograma obtido por TGA.

### 2.6.3 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A caracterização dos grupamentos funcionais dos polímeros foi feita por espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR), em equipamento da Perkin Elmer Spectrum One, no intervalo de  $4.000$  a  $450\text{cm}^{-1}$  pela técnica de reflectância difusa.

### 2.6.4. Difratomia de raio-X

A cristalinidade foi estudada para os filmes de P(3HB) sintetizados com diferentes concentrações de ácido oléico pela técnica de difração de raio-X. Os difratogramas de raios-X das amostras foram obtidos em um difratômetro de raios-X da marca SHIMATZU, modelo XRD 6000, com fonte de radiação  $\text{CuK}\alpha$ , com ângulo  $2\theta$  e varredura de 10 a  $70^\circ$ . O percentual de cristalinidade foi calculado medindo-se a(s) área(s) do(s) pico(s) e a área total do difratograma.

## **2.7 Ensaios de biodegradação**

O preparo do solo e os ensaios de biodegradação realizados neste trabalho seguiram a metodologia do teste *soil burial* e foram executados com base na norma ASTM G160 – 98.

### **2.7.1 Preparação do solo**

O solo foi preparado com partes iguais de solo fértil (com baixo teor de argila), esterco de cavalo e areia de praia (42mesh). A massa total da terra seca foi de 15kg. Após a mistura, a terra foi peneirada com uma peneira de 4mesh. A terra foi envelhecida por três meses e reexaminada duas vezes por mês monitorando-se o pH (6,5 a 7,5) e a umidade (20 a 30%). O pH do solo foi monitorado nesse período e mantido entre 6,5 e 7,5 mediante adição de calcário ou enxofre, respectivamente para aumentar ou abaixar o pH.

Após os três meses, foi realizado um controle de viabilidade que consistiu em enterrar um pano de algodão ( $400$  a  $475\text{g/m}^3$ ) e medir a resistência à tração após cinco dias. Havendo perda de 50% dessa propriedade, a terra é considerada própria para uso. Após obtenção de resultado positivo nesse teste, a terra foi acondicionada em copos de Becker de 1L com cerca de 17cm de altura, que foram utilizados nos testes de biodegradação.

### **2.7.2 Ensaio de biodegradação**

Os filmes obtidos a partir dos cultivos de *Ralstonia eutropha* em diferentes concentrações de ácido oléico (0, 0,3, 0,9, 1,5, 3,0g/L) foram submetidos aos ensaios de biodegradação em solo. Para tanto foram utilizados copos de Becker contendo a amostra cortada no tamanho  $5 \times 5$  cm.

A umidade do solo foi mantida entre 20 e 30%, com base na massa seca do solo. A água perdida durante o experimento devido à evaporação foi recolocada sem deformar o solo. Os copos de Becker foram inseridos em um ambiente capaz de manter a temperatura em  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  e a umidade entre 85 e 95%.

As amostras foram removidas após 7, 14 e 21 dias, cuidadosamente lavadas em água destilada e secas em estufa a vácuo a  $40^\circ\text{C}$  por 24 horas. Foram avaliadas mudanças nas propriedades térmicas (DSC e TGA) e visuais.

## **2.8 Estudo das blendas poliméricas P(3HB)/PCL**

### **2.8.1 Polímeros utilizados**

O P(3HB) em pó usado neste estudo foi fornecido pela PHB Industrial (saco 01/02, lote: L-58-2). A massa molar média do P(3HB) foi determinada experimentalmente por GPC sendo igual a  $34 \cdot 10^4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . A policaprolactona (PCL) da Sigma-Aldrich apresentou massa molar ( $M_w$ ) igual a  $6,0 \cdot 10^4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , segundo informações do fabricante. O clorofórmio utilizado como co-solvente foi fornecido pela Synth.

### **2.8.2 Preparação dos homopolímeros e das blendas por evaporação lenta de solvente**

Foram preparados homopolímeros e blendas de P(3HB)/PCL por evaporação de solvente à temperatura ambiente nas composições de 0/100, 20/80, 50/50, 80/20 e 100/0% (m/m). O P(3HB) e a PCL foram dissolvidos separadamente em clorofórmio para formar

soluções 1% (m/V), sendo mantidas em agitador magnético durante um período de 2 horas até completa homogeneização das soluções. Após a união, as soluções foram mantidas também sob agitação por 1 hora. Por fim, a solução final foi vertida em placas de Petri e inserida em uma cuba (figura 2.4). Após esse período, os filmes foram secos em estufa a vácuo por 24 horas à temperatura de 28°C (VOGELSANGER *et al.*, 2003).

### 2.8.3 Técnicas analíticas para caracterização dos homopolímeros e das blendas poliméricas (estudo da miscibilidade das blendas)

Para avaliar a miscibilidade das blendas, as amostras dos filmes dos homopolímeros foram comparadas às amostras das blendas nas diferentes composições e avaliadas segundo as técnicas de calorimetria diferencial exploratória (DSC) (item 2.6.1), análise termogravimétrica (TGA) (item 2.6.2) e microscopia eletrônica de varredura (SEM) (item 2.8.4.1).

### 2.8.4. Ensaios de biodegradação

Para cada composição P(3HB)/PCL 0/100, 20/80, 50/50, 80/20, 100/0 foram utilizados dois copos de Becker (duplicata), contendo três amostras, cortadas no tamanho 5 × 5cm. As amostras foram removidas após 7, 14, 21, 28, 34 e 62 dias, cuidadosamente lavadas em água de torneira e secas em estufa a vácuo a 28°C por 24 horas. Foram avaliadas mudanças nas propriedades térmicas, físico-químicas e morfológicas.

As alterações provenientes da biodegradação dos polímeros puros e das blendas foram avaliadas pelas seguintes técnicas de caracterização: análise macroscópica; microscopia eletrônica de varredura (SEM) para avaliação morfológica; calorimetria diferencial exploratória (DSC) (conforme item 2.6.1) para monitorar eventuais alterações na cristalinidade, na temperatura de fusão e variação na entalpia de fusão, e análise termogravimétrica (TGA) (conforme item 2.6.2), na qual foram monitoradas as temperaturas de início da degradação ( $T_{\text{inicial}}$ ) e temperatura máxima de degradação ( $T_{\text{pico}}$ ).

#### **2.8.4.1 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)**

Fragmentos da superfície de fratura dos filmes – fraturados em nitrogênio líquido e na superfície superior dos filmes – foram fixados em um suporte metálico e recobertos com ouro, utilizando-se um metalizador de amostras Sputer Coater BAL-TEC SCD 050 (aproximadamente 20mm de espessura) e observados ao microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM 940A, utilizando-se tensão elétrica de 10kV.

*O prazer no trabalho aperfeiçoa a obra.*

(Aristóteles)

## Capítulo 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### **SÍNTESE DE P(3HB) POR *Ralstonia eutropha* COM USO DE ÁCIDO OLÉICO COMO SUPLEMENTO NUTRICIONAL**

Um dos principais obstáculos à produção industrial de P(3HB) é seu alto custos de produção. No entanto, muitos estudos têm sido conduzidos na tentativa de minimizar esses custos com o uso de substratos e suplementos nutricionais de baixo custo, desenvolvimento de novas linhagens e técnicas mais eficientes de extração do polímero. O objetivo principal dos resultados descritos neste capítulo foi avaliar o cultivo de *Ralstonia eutropha* na fase de crescimento celular e de produção do polímero frente às temperaturas de 30°C e 37°C e mediante a adição de ácido oléico por meio de diferentes estratégias. Os ensaios preliminares foram realizados em frascos agitados sendo posteriormente ampliado para biorreator em cuba de 4L.

## Uso de ácido oléico como suplemento em culturas para crescimento e/ou produção de P(3HB) e temperaturas de 30°C e 37°C

A síntese de P(3HB) por *Ralstonia eutropha* foi estudada tendo ácido oléico como suplemento nutricional em concentrações variando entre 0 e 3,0g/L em culturas utilizando glicose e frutose como fonte de carbono. As células foram cultivadas por 24h (com amostragens em zero, 16 e 24h), tendo o ácido oléico sido acrescentado no início da cultura não limitada em nitrogênio a fim de avaliar a influência da adição desse ácido graxo sobre o crescimento celular (item 3.1.a). Para avaliar a influência da adição de ácido oléico sobre a produção do polímero (ensaios conduzidos por 24h, com amostragens a cada 2h), o ácido graxo foi adicionado no final da fase estacionária de crescimento (início da fase de produção do polímero) e a concentração de sulfato de amônia inicial foi alterada de 5,0g/L para 2,3g/L, o que permitiu o esgotamento do nitrogênio após uma fase de crescimento não limitado (item 3.1.b). Embora Aragão (1996) tenha demonstrado que a limitação em fósforo é mais indicada do que em nitrogênio, pois não há interrupção brusca da síntese de proteína, optou-se neste trabalho pela carência em nitrogênio. A limitação em fósforo não é possível de ser atingida em frascos agitados porque este elemento tem um efeito tamponante, necessário para manutenção do pH durante as culturas. O objetivo do trabalho foi verificar a influência dos fatores temperatura e adição de ácido oléico, sem buscar culturas com alta densidade celular.

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

necessidade de gasto excessivo de energia com sistemas de resfriamento, foi realizado um estudo comparativo entre as temperaturas de 30°C e 37°C para síntese celular e produção de polímero. Os ensaios foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer contendo 300 mL de meio MM.

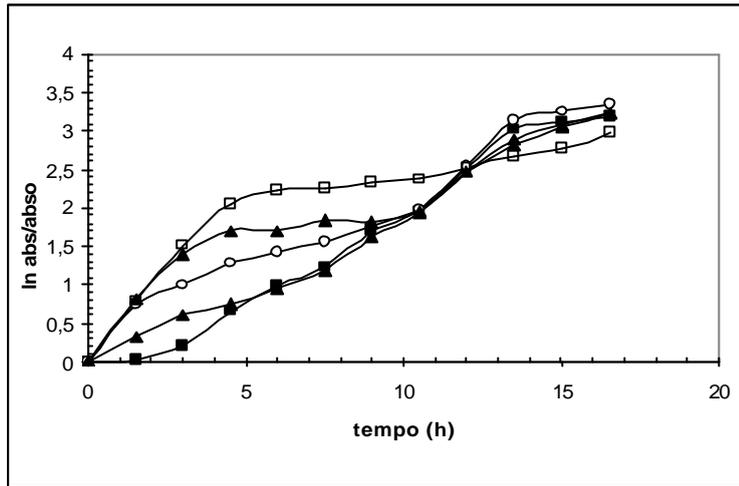
### ***3.1 Ensaios preliminares em frascos agitados***

#### ***3.1.1 Efeito da suplementação na fase de crescimento celular***

A figura 3.1 apresenta o perfil de crescimento celular (expresso em  $\ln$  da absorbância sobre a absorbância inicial) para os cultivos com diferentes concentrações de ácido oléico realizados a 30°C. A tabela 3.1 resume alguns parâmetros cinéticos para as diferentes condições testadas. No anexo 2 encontram-se as curvas de absorbância, logaritmo neperiano da absorbância ( $\ln$  abs) e consumo de substrato em função do tempo de cultivo para todas as concentrações de ácido oléico avaliadas.

Considerando que a presença do ácido graxo na temperatura de 30°C, não interferiu na absorbância inicial, nota-se claramente pela figura 3.1 que a adição de ácido oléico provocou um aumento na velocidade de crescimento, demonstrado pelo rápido incremento da absorbância em relação à cultura controle, na medida em que a concentração de ácido oléico aumentou. Embora os autores não descrevam os resultados em termos de velocidade de crescimento, AKIYAMA *et al.*(1992), avaliaram o efeito de n-alcenoatos (comprimento da cadeia variando de C2 a C22) como única fonte de carbono na concentração de 3,0g/L, em frascos agitados, e obtiveram uma concentração celular pouco maior do que 2,0g/L para substratos variando entre C11 a C19. Eles ressaltam a parca solubilidade desses alcenoatos no meio de cultura.

Os resultados obtidos neste trabalho, tendo a cultura glicose e frutose como substrato e sido suplementada com ácido oléico (3,0g/L), permitiram atingir a concentração celular igual a 6,96 g/L em 6h de cultivo.

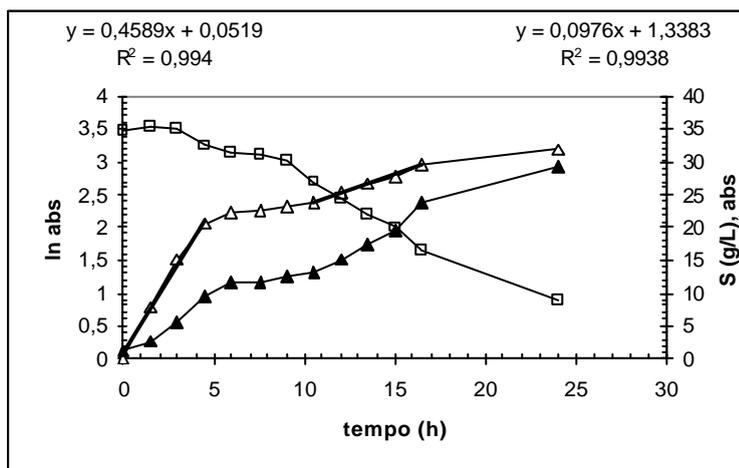


Concentração de AO

□ = 0g/L  
 ○ = 0,3g/L  
 △ = 0,9g/L  
 ▲ = 1,5g/L  
 ■ = 3,0g/L

**Figura 3.1** Crescimento celular de *Ralstonia eutropha* (expresso em  $\ln \text{abs}/\text{abs}_0$ ) em função do tempo com diferentes quantidades de de ácido oléico utilizado como suplemento a 30°C

Analisando-se a curva de absorvância (figura 3.2) (as demais curvas encontram-se no anexo 2 – figuras 2.1 a 2.5) percebem-se claramente duas fases exponenciais de crescimento. Na primeira fase, a velocidade específica de crescimento aumenta com o aumento da concentração de ácido oléico. Em seguida, nota-se uma fase lag (exceto para a condição sem ácido oléico), cujo tempo de duração foi crescente com o aumento da concentração do ácido graxo. No entanto, na segunda fase, a velocidade específica de crescimento decresce à medida que a concentração de ácido oléico aumenta.



▲ = absorvância  
 □ = consumo de glicose/frutose  
 △ =  $\ln \text{abs}$

**Figura 3.2** Crescimento celular de *Ralstonia eutropha* a 30°C com 3,0g/L de ácido oléico

A análise do consumo de substrato até o final da 1ª fase exponencial e a quantidade de célula produzida, para cultura contendo 3,0g/L de ácido oléico, mostra um fator de conversão de substrato em célula (em 6h de cultivo) igual a 1,40g/g. Este resultado mostra claramente que um outro substrato foi utilizado. Calculando-se este fator de conversão em CmolX/CmolS, obtém-se o valor igual a 1,6. Segundo Roels (1983), o fator de conversão teórico expresso em Cmol de células por Cmol de glicose é 0,6CmolX/CmolS. Supondo que o ácido oléico foi consumido, o fator de conversão será 0,77Cmol/Cmol, sendo este valor mais próximo do sugerido por Roels.

Os resultados sugerem que todo ácido oléico presente está sendo utilizado na primeira fase. Considerando que a oxidação de ácidos graxos é extremamente exorgônica, ou seja, a função da oxidação dos ácidos graxos é gerar energia metabólica, o aumento da concentração de ácido graxo está estimulando o crescimento celular. Isto é observado uma vez que, ao final da primeira fase de crescimento celular, tem-se 1,02, 2,10, 2,64 e 6,96g/L de células para as concentrações iniciais de ácido graxo de 0,3, 0,9 1,5 e 3,0g/L, respectivamente, para o cultivo conduzido a 30°C.

**Tabela 3.1 Valores de biomassa, produtividade em células ( $P_x$ ) e fatores de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S_{gli}}$ ) para concentrações crescentes de ácido oléico a 30°C e 37°C (para 6h de cultivo) e velocidade específica de crescimento ( $\mu$ )**

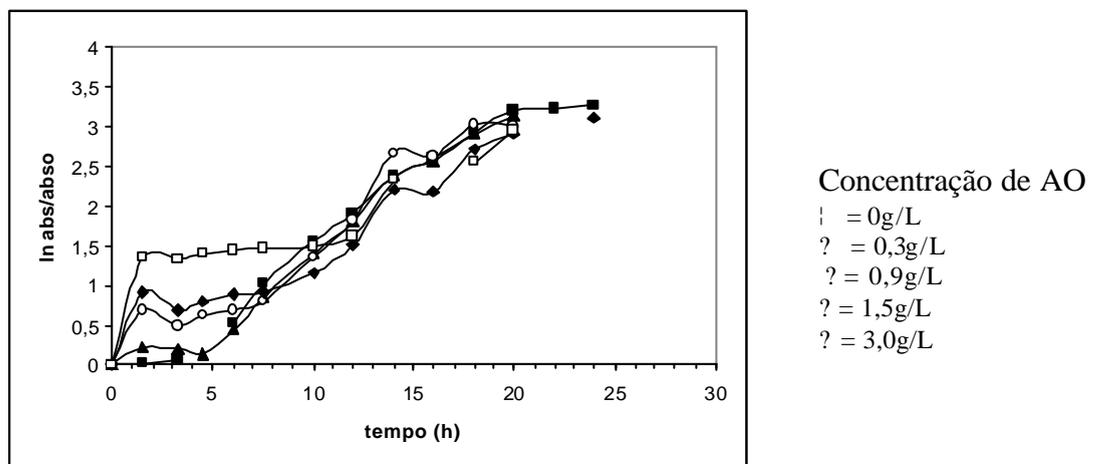
Conc. de ácido oléico (g.L <sup>-1</sup> )	Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )		$P_x$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )		$\mu$ (h <sup>-1</sup> )		$Y_{X/S_{gli}}$ (g/g)		$Y_{X/S_{gli}}$ (Cmol/Cmol)		$Y_{X/S_{gli}+Soleico}$ (Cmol/Cmol)	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
0	1,02	1,38	0,17	0,23	0,25	0,22	0,25	0,69	0,30	0,80	0,30	0,80
0,3	1,02	1,24	0,17	0,21	0,15*	0,20	0,51	0,49	0,60	0,60	0,47	0,41
0,9	2,10	1,69	0,35	0,28	0,16*	0,21	0,7	0,42	0,83	0,50	0,53	0,35
1,5	2,64	2,46	0,44	0,40	0,35*	0,18	0,75	1,23	1,03	1,50	0,50	0,61
3,0	6,96	4,5	1,16	0,75	0,45*	0,19	1,40	---	1,60	----	0,77	0,94

\* 1ª fase exponencial; \*\* 2ª fase exponencial

Cada ciclo de  $\beta$ -oxidação (via metabólica do ácido graxo) produz um NADH, um FADH<sub>2</sub> e uma acetil-CoA. A oxidação do acetil-CoA pelo ciclo do ácido cítrico gera um FADH<sub>2</sub> e três NADHs adicionais, os quais são reoxidados por meio da fosforilação oxidativa, formando ATP (VOET *et*

al.2000), favorecendo o crescimento celular. Kahar *et al.* (2004) verificaram que a hidrólise de óleo vegetal por lipases microbianas leva à formação de ácidos graxos, que são liberados no meio de cultura. Em seguida, esses ácidos graxos são transportados através da membrana e metabolizados via  $\beta$ -oxidação em *Ralstonia eutropha*. Sugere-se que a presença dessas substâncias no meio de cultura pode afetar positivamente o crescimento celular, uma vez que experimentos anteriores haviam mostrado que *R. eutropha* tinha um bom crescimento sobre ácido palmítico, ácido oléico e ácido linoléico. Contudo o elevado número de células, produzidas na primeira fase de crescimento, esgota o substrato (ácido oléico) e como consequência ao final dessa fase ocorre diminuição da velocidade de crescimento.

Dessa forma, em aproximadamente 6h de cultura, para a condição de 3,0g/L de ácido oléico e 30°C, obteve-se um valor de produtividade em células de 1,16 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. O comportamento observado a 30°C é similar ao que se observa a 37°C em relação à formação das duas fases de crescimento (figura 3.3), porém de uma forma mais acentuada. Neste caso, a primeira fase de crescimento exponencial foi curta (duração de aproximadamente 2h) se comparada a 30°C (~3,5h). Após o término da primeira fase exponencial, como observado no cultivo a 30°C, o aumento da concentração de ácido oléico proporcionou a existência de uma fase lag crescente com o aumento da concentração de ácido oléico.



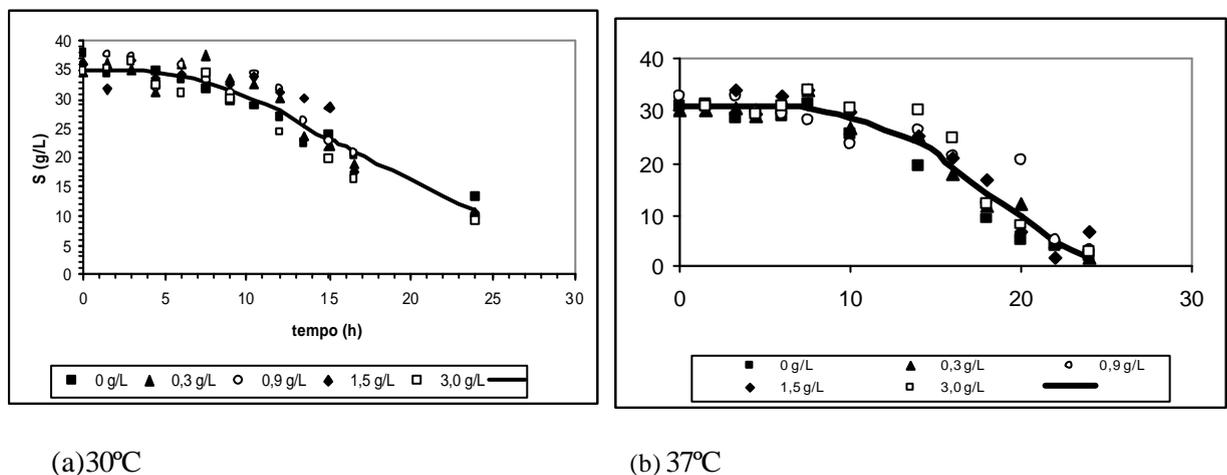
**Figura 3.3** Crescimento celular de *Ralstonia eutropha* expresso em  $\ln \text{abs}/\text{abs}_0$  em função do tempo para diferentes quantidades de ácido oléico utilizado como suplemento a 37°C

Nestas condições (37°C) porém, houve uma variação discreta para o valor da velocidade específica de crescimento na segunda fase exponencial (tabela 3.1), de forma que, a concentração celular no final do cultivo foi semelhante em todas as condições. Os valores de produtividade para 6h de cultivo, a 37°C foram crescentes com o aumento da concentração de ácido oléico, porém a partir de 0,9g/L de ácido oléico, foram inferiores ao cultivo realizado a 30°C. Considerando-se a extensão da fase lag e a menor produtividade em células na presença de ácido graxo, sugere-se que 37°C não é uma temperatura interessante para condução do processo de crescimento celular sem limitação de nitrogênio. No entanto, na ausência do ácido graxo, a temperatura de 37°C parece ser favorável ao crescimento microbiano, como pode ser observado pelos valores de biomassa, produtividade e fator de conversão de substrato em células iguais a 1,38g/L, 0,23g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e 0,8CmolX/CmolS.

Como pode ser observado na tabela 3.1, em ausência de ácido oléico, a velocidade específica máxima de crescimento foi 0,25h<sup>-1</sup> para temperatura de 30°C e 0,22 h<sup>-1</sup> para 37°C. Estes resultados estão de acordo com Marangoni e colaboradores (2001) que, avaliando o crescimento celular de *Ralstonia eutropha* na presença de 20g/L de lactose hidrolisada como fonte de carbono, nas temperaturas de 30°C e 34°C, obtiveram resultados similares para a velocidade específica máxima de crescimento, sendo 0,22h<sup>-1</sup> e 0,25h<sup>-1</sup> para 30 °C e 34°C.

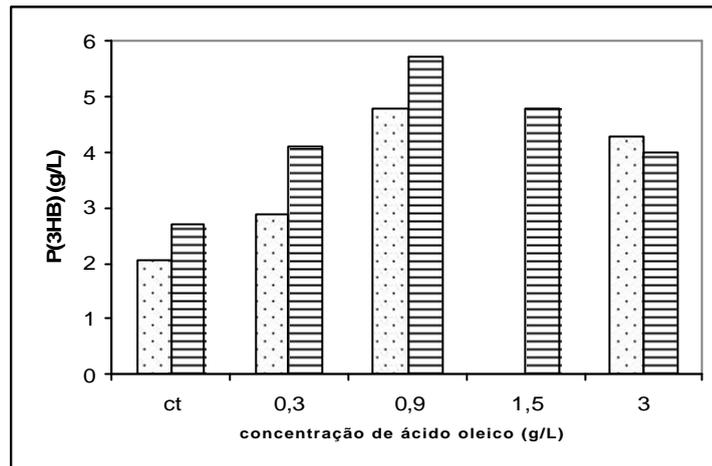
Dalcanton (2006) estimou, com base no modelo matemático de Gompertz Modificado, a velocidade específica máxima de crescimento de *Ralstonia eutropha*, tendo como fonte de carbono glicose nas temperaturas de 30°C, 32,5°C, 35°C, 37,5°C e 40°C. Os resultados para velocidade específica máxima de crescimento foram 0,21h<sup>-1</sup>, 0,24h<sup>-1</sup>, 0,24h<sup>-1</sup>, 0,23h<sup>-1</sup>, 0,35h<sup>-1</sup> respectivamente. O autor observou que, não houve diferença no logaritmo da população, para as temperaturas de 30°C e 37,5°C, o que significa que foi atingida a mesma massa celular em todas as temperaturas, como também observado nas figuras 3.1 e 3.3 deste trabalho.

O substrato, no entanto, foi totalmente consumido em 24h para temperatura de 37°C (figura 3.4), enquanto que para o ensaio a 30°C cerca de 10g/L de açúcar invertido permaneceram no meio de cultivo. Considerando que para produção de P(3HB) por *Ralstonia eutropha*, há a necessidade de limitação em um ou mais nutrientes essenciais ao crescimento e excesso da fonte de carbono entre 10 e 40g/L (ANDERSEN e DAWES, 1990), a síntese de P(3HB) foi avaliada apenas em 24h de cultivo. A figura 3.5 mostra que a síntese de polímero foi crescente com o aumento da concentração de ácido oléico até 0,9g/L, decrescendo para valores acima deste. A não suplementação do meio levou a uma menor quantidade de polímero em ambas as temperaturas. Embora a elevação da temperatura não tenha sido favorável ao crescimento celular, a produção de P(3HB) foi 20% a 40% melhor em concentrações de ácido graxo variando entre 0 e 0,9g/L na temperatura de 37°C.



[—] mostra a tendência de consumo em todas as condições

**Figura 3.4** Consumo de glicose/frutose por *Ralstonia eutropha* em função do tempo para diferentes concentrações de ácido oléico utilizado como suplemento



**Figura 3.5** Produção de P(3HB) por *Ralstonia eutropha* em função da concentração de ácido oléico utilizado como suplemento para as temperaturas de 30°C (pontilhado) e 37°C (listado)

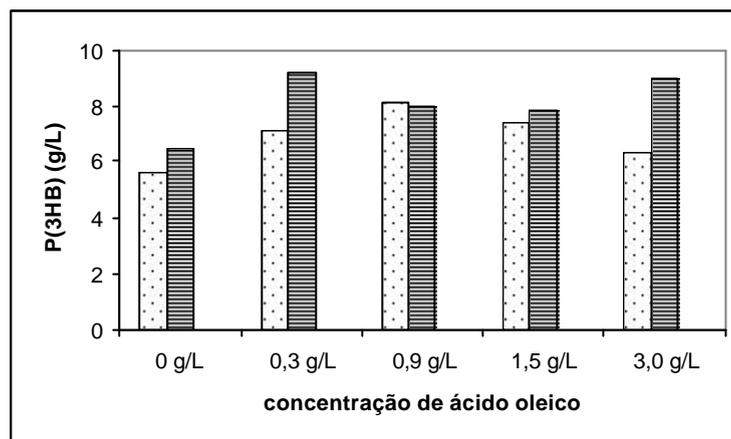
### 3.1.2 Efeito da suplementação na fase de produção do polímero

Os resultados da concentração de P(3HB) após 24h de cultivo com pulso de ácido oléico (em diferentes concentrações) no início da fase de produção, são apresentados na figura 3.6 para 30°C e 37°C. Os perfis cinéticos contendo o consumo de substrato e crescimento celular são apresentados no anexo 3 para as temperaturas de 30°C e 37°C.

As velocidades específicas de crescimento foram determinadas pela regressão linear das curvas de  $\ln \text{abs}/\text{abs}_0$  e os valores obtidos foram 0,20 e 0,22  $\text{h}^{-1}$  para temperaturas de 30°C e 37°C, respectivamente (anexo 3). Cabe salientar que não houve diferença no valor das velocidades específicas máximas de crescimento para os cultivos com diferentes concentrações e sem ácido oléico, pois sua adição ocorreu após o final da fase de crescimento celular, início da fase de produção do polímero.

A adição de ácido oléico permitiu um incremento na produção de P(3HB) de 18% e 42% para as temperaturas de 30°C e 37°C, respectivamente. Os resultados, além de ratificar os ensaios descritos no item 3.1.a, estão de acordo com os reportados por Formolo *et al.* (2004), que investigaram o uso de óleos vegetais, nessas temperaturas, como suplementos nutricionais para produção de P(3HB) por *R. eutropha*.

Embora o aumento da temperatura de 30°C para 37°C tenha levado a um aumento na produção de P(3HB) para todos os ensaios (Figura 3.6), não foi observada uma correlação linear entre a concentração de ácido oléico adicionado e a concentração de P(3HB) produzido. Os experimentos onde foram obtidas as maiores concentrações de P(3HB) referem-se às concentrações de 0,3 e 3,0g/L para a temperatura de 37°C, o que é confirmado pelos parâmetros de produtividade e conversão de substrato em polímero (tabela 3.2) (SCHNEIDER *et al.*, 2004).



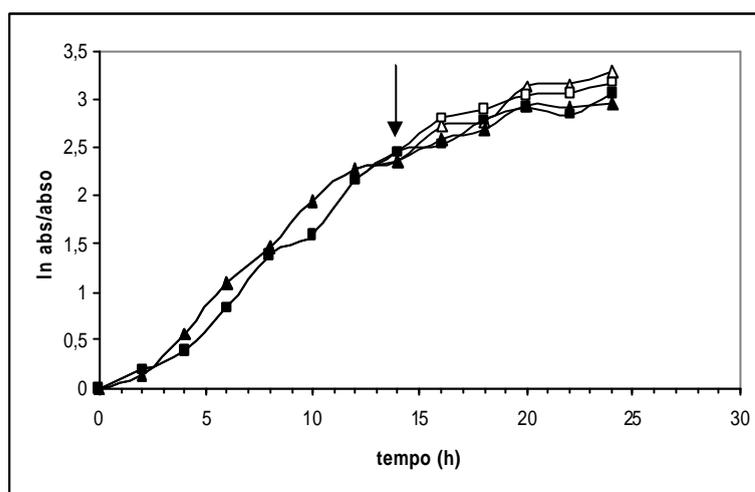
**Figura 3.6** Produção de P(3HB) por *Ralstonia eutropha* a 30°C (pontilhado) e 37°C (listrado) após 24h de cultivo, em função da concentração do ácido oléico

A figura 3.7 apresenta a evolução da biomassa em função do tempo de cultivo para as temperaturas de 30°C e 37°C, sem adição e na concentração de 3,0g/L de ácido oléico. Nessas condições de cultivo (pulso de ácido graxo no início da fase de produção e concentração inicial de nitrogênio em 2,3g/L) não há interferência da temperatura sobre a produção celular. No entanto, a temperatura de 37°C tende a favorecer a síntese do polímero (figura 3.8). A 37°C, com adição de 3,0 g/L de AO, obteve-se o melhor valor para produção de P(3HB) (CAPANEMA *et al.*, 2004).

Dalcanton (2006) verificou o efeito da temperatura (30°C, 35°C e 40°C) sobre a produção do polímero após pulso de óleo de soja e constatou que os ensaios conduzidos a 35°C resultaram em aproximadamente o dobro da concentração de P(3HB) quando comparado ao cultivo a 30°C. A suplementação de óleo de soja também favoreceu a produção do polímero.

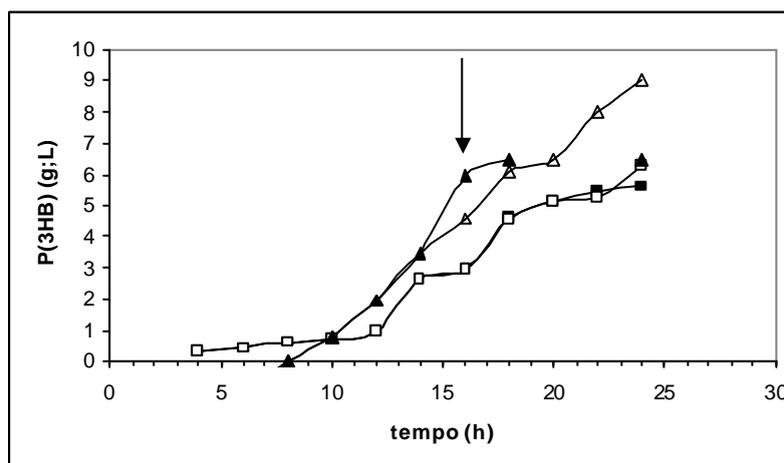
**Tabela 3.2** Produção de P(3HB), produtividade em polímero e fator de conversão de substrato em polímero após 24h de cultivo de *R. eutropha*, nas temperaturas de 30 e 37°C, em função de diferentes concentrações de ácido oléico

Acido oléico (g/L)	P(3HB) (g.L <sup>-1</sup> )		P <sub>P(3HB)</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )		Y <sub>P(3HB)/S</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
0	5,60	6,48	0,23	0,27	0,22	0,25
0,3	7,10	9,20	0,29	0,38	0,31	0,40
0,9	8,12	8,04	0,33	0,33	0,34	0,35
1,5	7,36	7,84	0,30	0,32	0,32	0,31
3,0	6,28	9,01	0,26	0,37	0,28	0,33



○ = 30°C, sem adição de ácido oléico  
 □ = 30°C, 3,0g/L de ácido oléico  
 △ = 37°C, sem adição de ácido oléico  
 ▽ = 37°C, 3,0g/L de ácido oléico  
 A seta representa o pulso de ácido oléico.

**Figura 3.7** Evolução do crescimento celular (expresso em absorvância) de *Ralstonia eutropha* em função do tempo de cultivo, da temperatura e da adição ou não de ácido oléico



○ = 30°C, sem adição de ácido oléico  
 □ = 30°C, 3,0g/L de ácido oléico  
 △ = 37°C, sem adição de ácido oléico  
 ▽ = 37°C, 3,0g/L de ácido oléico  
 A seta representa o pulso de ácido oléico.

**Figura 3.8** Evolução da produção de P(3HB) em função do tempo de cultivo, da temperatura e da adição ou não de ácido oléico

### **Considerações finais**

Os resultados obtidos nos ensaios em frascos agitados mostraram uma maior produtividade em células quando foi adicionado ácido oléico a 3,0g/L no início do crescimento, à temperatura de 30°C. Na fase de produção, a melhor opção de adição foi observada a 37°C com 0,3 ou 3,0g/L de ácido oléico, podendo não haver diferença significativa entre as concentrações de ácido oléico para produção de P(3HB).

### 3.2 Ensaios realizados em biorreator

A proposta de continuação do trabalho foi de estudar estratégias que associassem os resultados obtidos em frascos agitados, conciliando a suplementação de ácido oléico às temperaturas de 30 e 37°C nas fases do crescimento microbiano e produção do polímero. Sendo assim, nestes experimentos visou-se o estudo da associação destas condições em cultivos conduzidos em biorreator. Para tanto, foi utilizado um fermentador MD.B.Braun com cuba 5L contendo 4L de volume útil, o que permitiu estudar mais detalhadamente o processo de produção de P(3HB) por *Ralstonia eutropha*.

Foram realizados seis experimentos:

- a) Sem adição de ácido graxo, realizado à temperatura constante de 30°C: essa cultura é normalmente utilizada na produção de P(3HB) e foi considerada a cultura controle (BT1);
- b) Sem adição de ácido graxo, realizado à temperatura constante de 37°C: cultura utilizada como padrão a 37°C para comparação com outros experimentos (BT2);
- c) Sem adição de ácido oléico, mas mantendo-se a temperatura de 30°C na fase de crescimento celular e 37°C na fase de produção de polímero: os resultados realizados em frascos agitados mostraram uma melhor condição de crescimento a 30°C e melhor condição de produção a 37°C (BT3);
- d) 3,0g/L de ácido oléico no início da fase de crescimento e temperatura de 30°C, com mudança para 37°C no início da fase de produção: a adição de 3,0g/L de ácido oléico na fase de crescimento mostrou uma melhor produtividade em células a temperatura de 30°C (BT4);
- e) 3,0g/L de ácido oléico no início da fase de crescimento e temperatura de 30°C, e adição de 3,0g/L no início da fase de produção a 37°C: a adição de 3,0g/L de ácido

oléico na fase de produção mostrou um melhor incremento na produção do polímero à temperatura de 37°C (BT5);

f) o resultado da melhor condição tendo a adição de óleo de canola em substituição ao ácido oléico (BT6).

### 3.2.1. Características gerais

Os resultados dos experimentos descritos acima são apresentados nas figuras 3.9 a 3.14 e foram avaliados em termos de cinética de crescimento (biomassa total ( $X_t$ ) e biomassa residual ( $X_r$ )), proteína (P) e síntese do polímero P(3HB) obtido para as diferentes estratégias de cultivo de *Ralstonia eutropha* em biorreator.

As curvas de percentual de concentração de oxigênio dissolvido (pO<sub>2</sub>%) e de consumo de substrato se encontram no anexo 4 (figuras 4.1. a 4.6). As curvas de consumo de substrato mostram os pontos de alimentação, de forma que a concentração de açúcar invertido se situasse entre 15g/L e 40g/L. Andersen e Dawes (1990) mostraram que concentrações inferiores a 10g/L ou superiores a 40g/L não permitiam a síntese do polímero.

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

concentrações abaixo de 0,2g/L de nitrogênio já permitem o acúmulo de P(3HB) durante a fase de crescimento não limitado. A segunda fase - fase de produção do polímero - ocorre após a exaustão do nitrogênio, sendo representada pela linha pontilhada com duração para todos os casos em 16h de produção. Nessa fase observou-se uma produção acentuada e crescente de P(3HB), enquanto que o aumento de biomassa residual ocorreu em menor escala ou foi inexistente.

Como proposto por Sonnleitner *et al.* (1979), a fase exponencial de crescimento e a fase de acúmulo de P(3HB) são separadas por um período de transição extremamente curto, com uma drástica mudança na regulação metabólica.

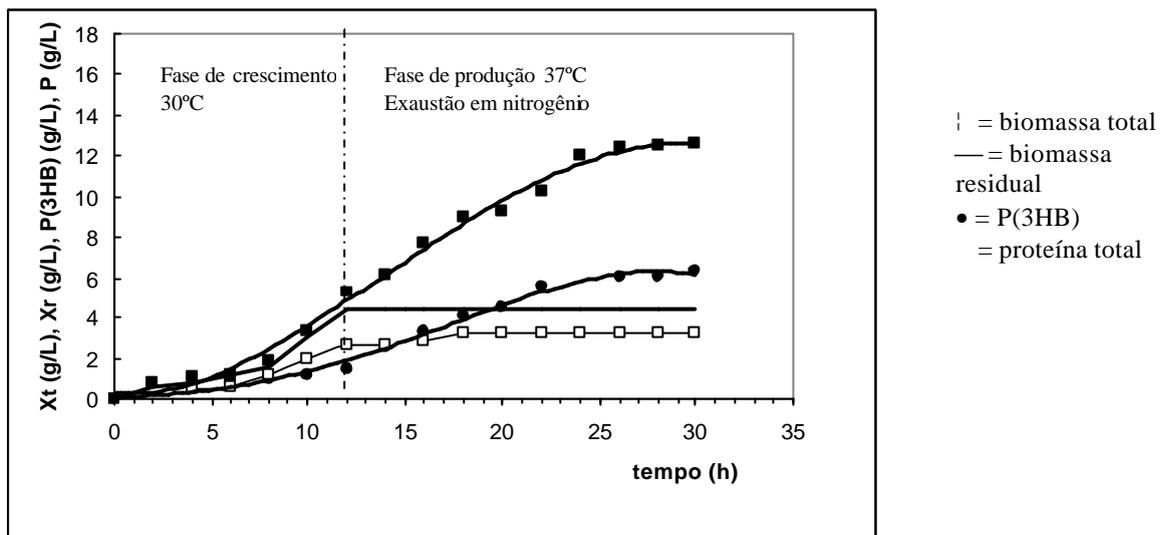
Lee *et al.* (1999) relatam que, sob condições suficientes de nitrogênio, o crescimento celular é evidenciado pelo aumento da concentração da biomassa residual (concentração celular menos a concentração de P(3HB)), como observado na fase de crescimento nas figuras 3.9 a 3.14. Por outro lado, a concentração da biomassa não aumenta sob condições limitadas em nitrogênio sendo o aumento da concentração celular total em decorrência do aumento da concentração de P(3HB) no interior da célula. No entanto, analisando as figuras 3.9 a 3.14, há um aumento da biomassa residual (em maior ou menor extensão) mesmo após a exaustão do nitrogênio. Doi e colaboradores (1989) *apud* Aragão (1996) também observaram este aumento e o justificam como decorrente da continuidade da síntese de proteínas sustentado pelo acúmulo de nitrogênio residual intracelular. Entretanto, como pode ser observado pelas figuras 3.9. a 3.14, a síntese de proteína, no presente estudo, cessa na fase limitada e a explicação parece pouco provável. Aragão (1996) analisou a composição elementar da biomassa durante as fases de crescimento e produção de P(3HB). A composição da biomassa na fase de crescimento foi de C H<sub>1,77</sub> O<sub>0,44</sub> N<sub>0,25</sub> S<sub>0,014</sub> P<sub>0,0076</sub> e para fase de produção C H<sub>1,61</sub> O<sub>0,44</sub> N<sub>0,14</sub> S<sub>0,077</sub> P<sub>0,01</sub>. Composição similar para biomassa na fase de

produção foi obtida por Yamane *et al.* (1996) e igual a  $C H_{1,76} O_{0,47} N_{0,18}$ . A relação de nitrogênio sobre a biomassa (Cmol) passou de 0,145 gN/X durante a fase de crescimento para 0,084 gN/X ao fim da cultura. Outra constatação foi que, ao comparar as células cultivadas em carência de nitrogênio (fase de produção do polímero) com as células cultivadas em limitação de nitrogênio, notou-se no primeiro caso, um aumento dos fosfolipídeos, do peptideoglicano e da camada de lipopolissacárideo (LPS), com uma forte concentração de polissacarídeos. A camada LPS e os fosfolipídeos são os principais constituintes da parede e membrana celular, respectivamente, das bactérias gram negativas (TORTORA, 2004). Esta observação permite sugerir que a variação na composição da biomassa durante a carência em nitrogênio é devido, principalmente, ao acúmulo dos componentes lipídicos da parede celular.

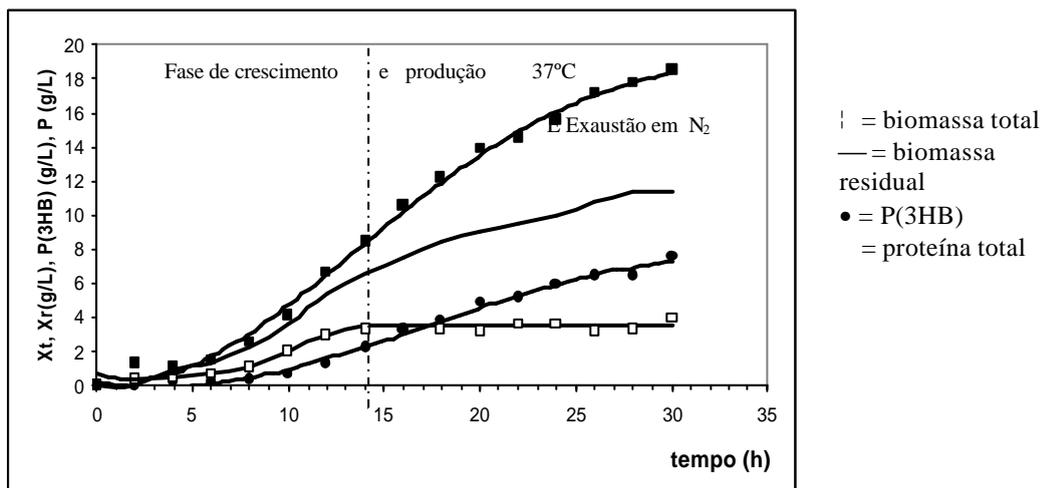
Isto pode explicar porque, nos ensaios realizados nesse trabalho, tenha ocorrido um aumento da biomassa residual embora a curva de proteína permanecesse constante após o esgotamento do nitrogênio.

Ainda segundo Aragão (1996), o fator de conversão experimental de nitrogênio em células ( $Y_{Xr/N}$ ) é igual a 7,3 g/g, o que corresponde a uma concentração de biomassa, no momento do esgotamento do nitrogênio, de 7,74g/L em ensaios sem limitação em nitrogênio e 3,5g/L em ensaios com limitação em nitrogênio. Como pode ser observado pela tabela 4.1 – Anexo 4, o valor de biomassa residual no momento da exaustão para as diferentes estratégias foi igual a 4,0g/L, elevando o valor encontrado para 8,3g/g. Para o cultivo a 37°C, cujo valor de biomassa residual foi de 6,0g/L, o valor do fator de conversão ( $Y_{Xr/N}$ ) é igual a 12,5g/g. Este fenômeno pode ter ocorrido em decorrência de uma maior permeabilidade da membrana celular com o aumento da temperatura, o que teria facilitado a absorção de nutrientes e/ou aumentado a eficiência na absorção de nutrientes (PELCZAR, 1996). A determinação dos valores para o fator de conversão de

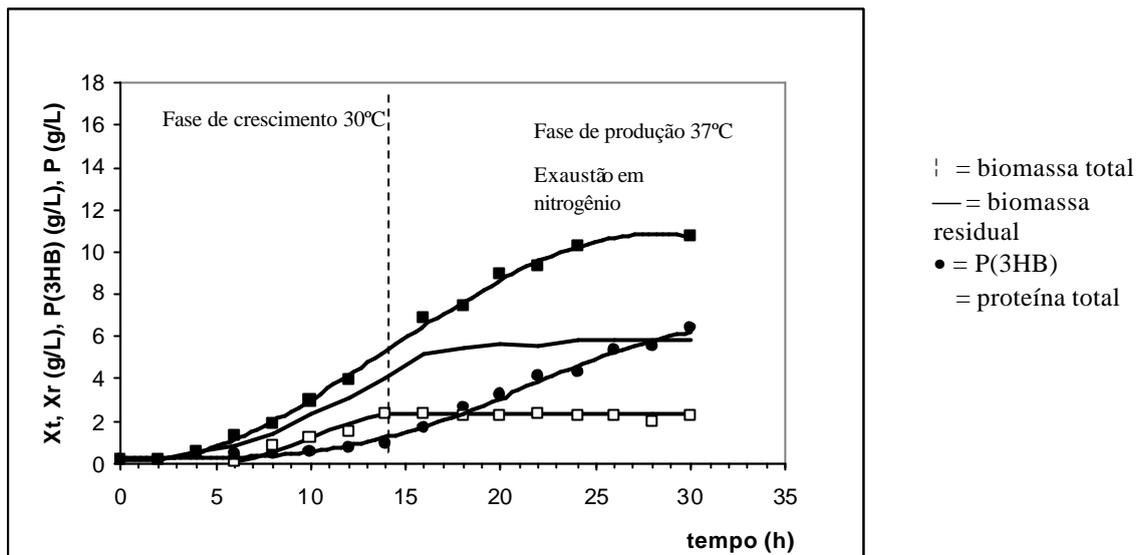
nitrogênio em células é muito importante para definir a extensão da replicação celular sendo isto fundamental em um processo onde o acúmulo do polímero ocorre sob condições limitadas de nutrientes. Gomez *et al.* (1997) determinaram o fator de conversão de nitrogênio em biomassa para *Burhholderia cepacia* (IPT – 044) (DSMZ 9241) igual a  $6,87 \text{ g}_{\text{cel}}/\text{g}_{\text{N}}$  e uma outra espécie isolada (IPT – 01) igual a  $6,62 \text{ g}_{\text{cel}}/\text{g}_{\text{N}}$ .



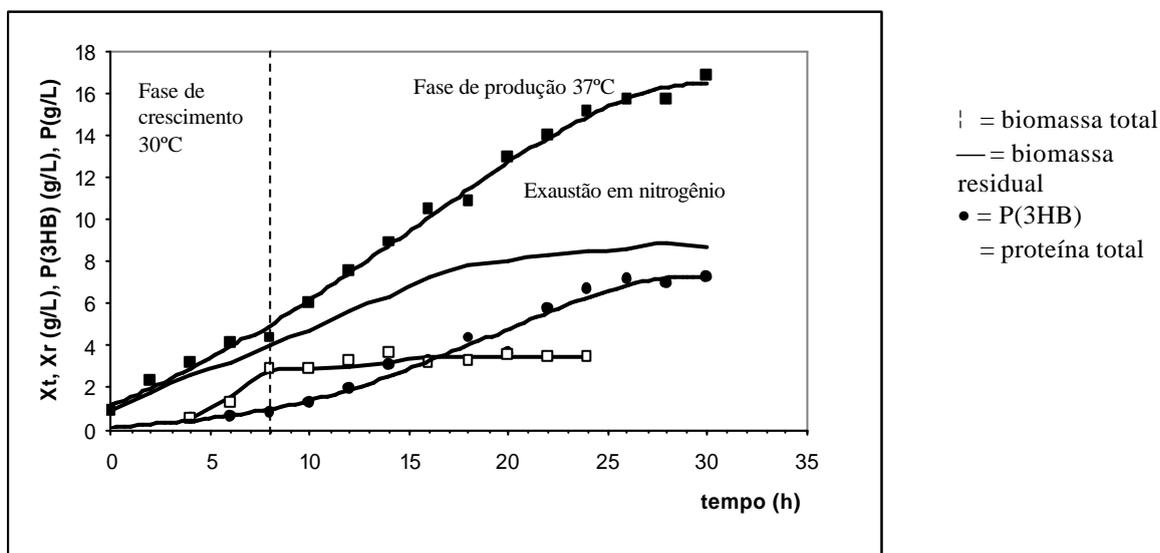
**Figura 3.9** BT1. Evolução em cultivo de batelada alimentada a 30°C



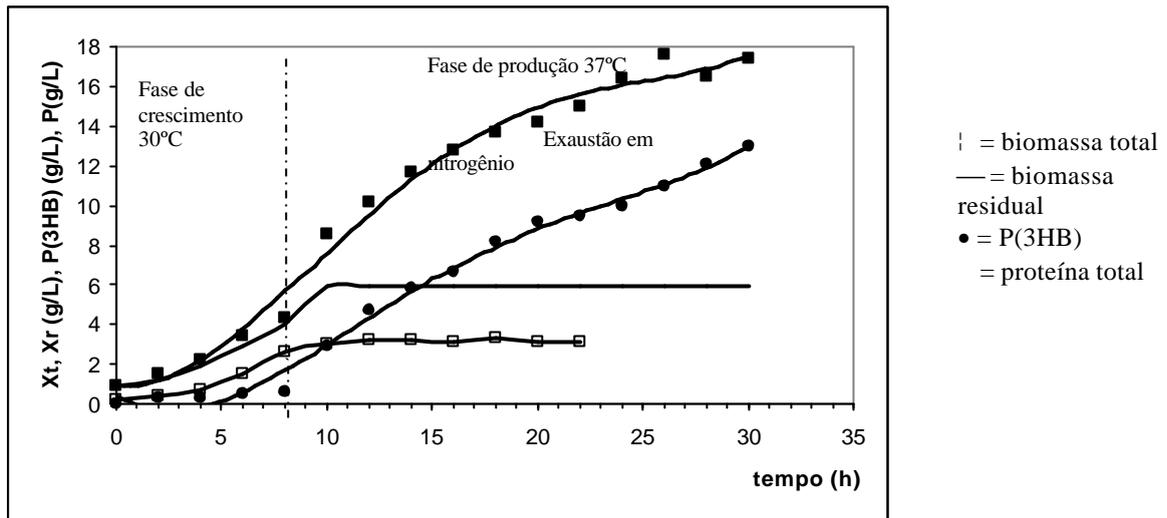
**Figura 3.10** BT2. Evolução em cultivo de batelada alimentada a 37°C



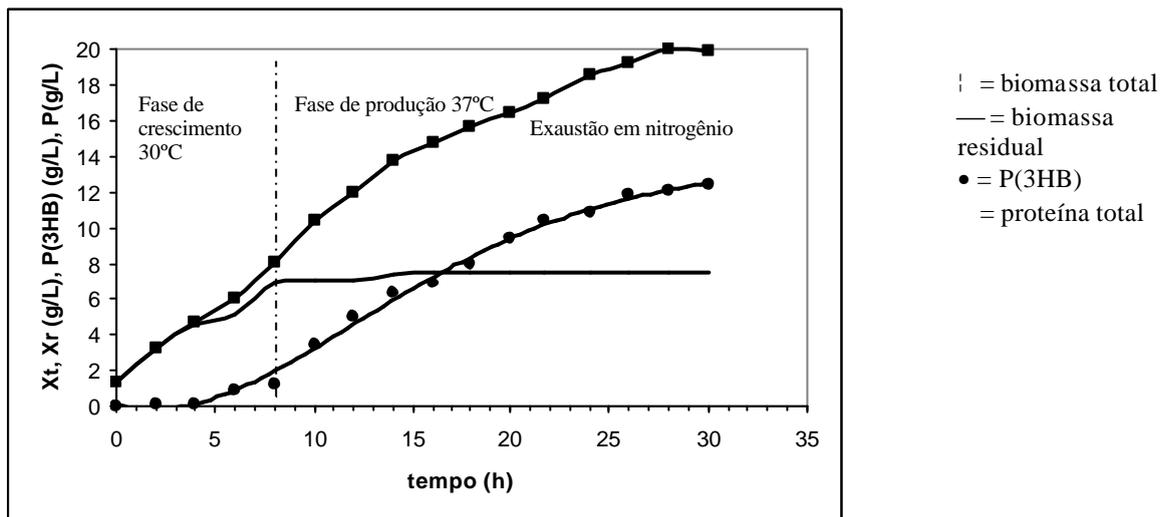
**Figura 3.11** BT3. Evolução em cultivo de batelada alimentada a 30°C na fase de crescimento e 37°C na fase de produção



**Figura 3.12** BT4. Evolução em cultivo de batelada alimentada a 30°C na fase de crescimento com adição de ácido oléico e 37°C na fase de produção



**Figura 3.13** BT5. Evolução em cultivo de batelada alimentada a 30°C na fase de crescimento, com adição de 3,0g/L de ácido oléico, e 37°C na fase de produção, com adição de 3,0g/L de ácido oléico



**Figura 3.14** BT6. Evolução em cultivo batelada alimentada a 30°C na fase de crescimento, com adição de óleo de canola (equivalente em 3,0g/L de ácido oléico), e 37°C na fase de produção, com adição de óleo de canola (equivalente em 3,0g/L de ácido oléico)

### 3.2.4. Efeito da temperatura de cultivo e da mudança de temperatura de 30°C para 37°C na fase de produção

Os dados e parâmetros dos cultivos estão resumidos nas tabelas 3.3 a 3.5. Na tabela 3.3 são apresentados os dados globais obtidos nas culturas com 30h de cultivo independente da duração das fases de crescimento e produção.

A comparação das duas culturas realizadas a temperatura constante (BT1 e BT2 – figuras 3.9 e 3.10; tabela 3.3), permite observar uma maior produção de biomassa total ( $X_t$ ) a 37°C. No cultivo conduzido a 37°C esta biomassa total está representada por  $X_r$  (anexo 4 - tabela 4.2), que atinge 11,5g/L no final da cultura. Esse resultado mostra que o aumento da temperatura influenciou positivamente o crescimento.

**Tabela 3.3** Concentração de biomassa total, biomassa residual máxima, P(3HB) máximo e substrato (açúcar invertido) consumido, considerando 30h de cultivo e os parâmetros globais de fator de conversão de substrato em biomassa residual e em P(3HB) e produtividade em biomassa residual e em P(3HB)

Estratégia	$X_t$ (g/L)	$X_{r\ max}$ (g/L) tempo (h)	$P(3HB)_{\max}$ (g/L) tempo (h)	S consumido global (30h) (g/L)	Y $X_r/S$ (g/g)	Y $P(3HB)/S$ (g/g)	$P_{X_r}$ (g.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	P $P(3HB)$ (g.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
30°C/sem AO (BT1)	12,0	6 em 16h	6 em 26h	32	0,18	0,18	0,37	0,23
37°C/sem AO (BT2)	19,0	11,5 em 28h	7 em 30h	48	0,24	0,15	0,41	0,25
30°C/37°C (BT3)	11,0	5,5 em 16h	6 em 30h	34	0,16	0,17	0,34	0,20
30°C+AO/37°C (BT4)	16,5	9 em 23h	7 em 26h	34	0,26	0,20	0,40	0,26
30°C+AO/37°C+AO (BT5)	17,5	6 em 10h	13 em 30h	37	0,16	0,35	0,60	0,43
30°C+CAN/37°C+CAN (BT6)	20,0	7,6 em 14h	12,5 em 30h	38	0,12	0,32	0,54	0,41

Os valores dos fatores de conversão de substrato em célula na fase de crescimento (tabela 3.4) para 30°C e 37°C foram 0,32g/g e 0,45g/g, respectivamente, e confirmam que a temperatura mais elevada favorece o crescimento. No entanto observou-se que, mesmo durante a fase de produção, houve um aumento da concentração de  $X_r$ , confirmada pelo valor de  $Y_{X_r/S}$  mais elevado para cultura a 37°C do que para 30°C (tabela 3.4). Uma possível explicação para o aumento da biomassa durante a fase de produção à temperatura de 37°C pode ser atribuída, como explicado anteriormente (item 3.2.1), ao acúmulo de material celular, particularmente os componentes da parede celular. Possivelmente a mesma mudança na composição

elementar de biomassa observada durante a fase de produção a 30°C (ARAGÃO, 1996) ocorre também a 37°C, levando a um aumento no fator de conversão  $Y_{Xr/N}$  (12,5g X/g N), como foi verificado.

Em relação à produção de P(3HB), ao final das culturas, o conteúdo de P(3HB) no interior da célula e o fator de conversão  $Y_{P(3HB)/S}$  foram de 50% e 40%, e 0,25 e 0,16g/g, respectivamente para as temperaturas de 30°C e 37°C (tabela 3.4). Esse resultado confirma que a cultura realizada em isoterma a 37°C favorece o crescimento, com menor acúmulo de P(3HB) do que a 30°C. Este resultado é contraditório com os obtidos em frascos agitados, que mostraram que o crescimento de *Ralstonia eutropha*, sem adição de ácido graxo, não foi influenciado pelo aumento da temperatura de 30°C para 37°C. No entanto em condições controladas em biorreator (pH e oxigênio), com medidas mais precisas de biomassa (massa seca), observou-se um favorecimento do crescimento a 37°C. Portanto, pode-se concluir que a maior produção de P(3HB) obtida nos ensaios conduzidos a 37°C, em frascos agitados, foi devida a maior quantidade de células e não a um maior acúmulo de P(3HB) intracelular.

**Tabela 3.4** Fator de conversão de substrato (açúcar invertido) em biomassa residual, conteúdo em P(3HB) e produtividade em biomassa residual e em P(3HB) para as fases de crescimento e produção de polímero

Estratégia	Fase de crescimento			Fase de produção			
	$Y_{Xr/S}$ (g/g)	% P(3HB)	$P_{Xr}$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$Y_{Xr/S}$ (g/g)	% P(3HB)	$P_{P(3HB)}$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$Y_{P(3HB)/S}$ (g/g)
30°C/sem AO (BT10)	0,32	20	0,32	0,10	50	0,31	0,25
37°C/sem AO (BT2)	0,45	25	0,42	0,16	40	0,34	0,16
30°C/37°C (BT3)	0,30	20	0,28	0,05	54	0,31	0,24
30°C+AO/37°C (BT4)	0,86*	20	0,49	0,25	40	0,31	0,25
30°C+AO/37°C+AO (BT5)	1,30*	30	0,49	0,08	63	0,50	0,32
30°C+CAN/37°C+CAN (BT6)	0,78	25	0,58	0,08	59	0,45	0,45

A tabela 3.5 apresenta os valores do fator de conversão em polímero e em células expressos em Cmol (ROELS, 1983) para as fases de crescimento e produção de P(3HB). Para estes cálculos, assumiu-se que todo ácido oléico foi utilizado na fase de crescimento e/ou na fase de produção, conforme a estratégia utilizada. Avaliando os dados da tabela 3.5 para verificar o efeito da mudança de temperatura sobre a fase de produção do polímero (BT1 e

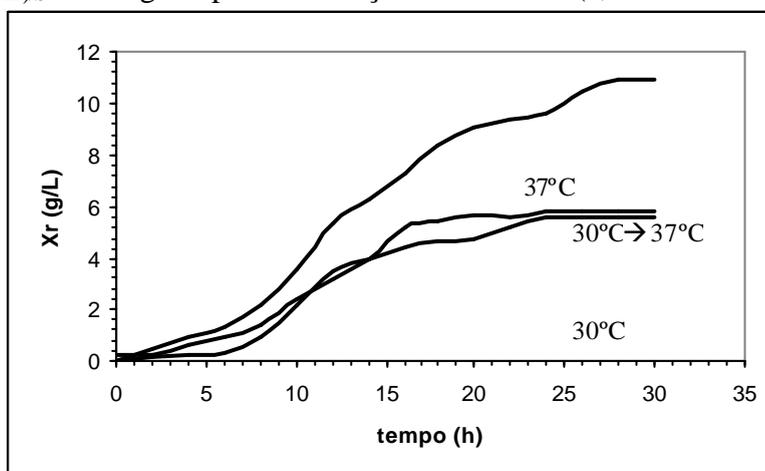
BT3), percebe-se que os maiores valores para o fator de conversão de substrato em células ocorrem na fase de crescimento.

Em condições balanceadas os valores de  $Y_{Xr/S_{cresc}}$  (expressos em Cmol) foram 0,40, 0,37 e 0,55 para as temperaturas de 30°C (BT1), 30°C (BT3) e 37°C (BT2) respectivamente, em comparação com o fator de conversão de substrato em células na fase de produção (condições não balanceadas) ( $Y_{Xr/S_{prod}}$ ) igual a 0,11, 0,07 e 0,18 (Cmol) para as temperaturas de 30°C, 37° e 37°C respectivamente na fase de produção.

**Tabela 3.5** Fatores de conversão de substrato em célula e em polímero para as diferentes estratégias e fases de cultivo (expresso em Cmol/Cmol)

Estratégia	$Y_{Xr/S}$ cresc.	$Y_{Xr/S}$ prod.	$Y_{P(3HB)/S}$ cresc.	$Y_{(3HB)/S}$ prod.
30°C/sem AO (BT1)	0,40	0,11	0,11	0,35
37°C/sem AO (BT2)	0,55	0,18	0,21	0,22
30°C/37°C (BT3)	0,37	0,07	0,10	0,35
30°C+AO/37°C (BT4)	0,46	0,28	0,13	0,35
30°C+AO/37°C+AO (BT5)	0,55	0,07	0,31	0,36

Portanto, comparando as temperaturas de 30°C e 37°C em ambas as fases, verificou-se que a temperatura de 37°C favorece a conversão do substrato em células. Isto também pode ser observado pelos perfis das curvas de biomassa residual (figura 3.15), uma vez que a concentração de biomassa é maior no cultivo a 37°C. No entanto, a mudança de temperatura de 30°C para 37°C na fase de produção não influenciou a conversão de substrato em células nem a produção de polímero, cujos valores de  $Y_{P(3HB)/S}$  foram iguais para as condições BT1 e BT3 (0,35 Cmol/Cmol).



**Figura 3.15** Evolução da biomassa residual para as temperaturas de 30°C e 37°C e para mudança de temperatura de 30°C → 37°C no final da fase de crescimento para os ensaios conduzidos em biorreator

Quanto ao fator de conversão de substrato em polímero observou-se menor síntese do polímero na fase de crescimento, ratificando que a produção do polímero para *Ralstonia eutropha* não está associado ao crescimento (SHIMIZU, *et al.*, 1993).

Na fase de produção, o carbono é utilizado para a produção de P(3HB), como pode ser observado pelos valores de  $Y_{P(3HB)/S}$  nesta fase (0,35 (BT1), 0,35 (BT3) e 0,22 (BT2)) em comparação ao  $Y_{P(3HB)/S}$  na fase de crescimento (0,11 (BT1), 0,10 (BT3) e 0,21 (BT2)). Mas a conversão de substrato em polímero foi mais eficiente quando a fase de crescimento celular foi conduzida a 30°C e não na temperatura de 37°C. A mudança de temperatura de 30°C para 37°C no final da fase de crescimento não teve influência na conversão de substrato em polímero confirmado pelos valores de 0,35 e 0,35Cmol/Cmol, respectivamente.

### **3.2.3 Efeito da adição de ácido oléico como suplemento nutricional na fase de crescimento e produção do polímero**

Analisando-se os parâmetros globais (tabela 3.3) para as condições testadas, verificou-se que a condição onde o ácido oléico foi adicionado nas duas fases (BT5) proporcionou a maior produtividade e conversão de substrato em polímero, sendo  $0,43\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  e  $0,35\text{g/g}$  respectivamente. De forma a verificar qual estratégia foi mais eficaz na produção do polímero os dados dos cultivos foram analisados por fases.

#### *a) Efeito da adição de ácido oléico na fase de crescimento celular (BT1 e BT3/BT4)*

A adição de ácido oléico na fase de crescimento celular foi feita com as culturas BT4 e BT5. Nestas culturas, observa-se na tabela 4.1 – anexo 4 que para um mesmo  $X_r$ , durante a fase de crescimento, houve um menor consumo de substrato. Este fato leva a um aumento nos fatores de conversão ( $Y_{Xr/S}$ ) (tabela 3.4) de  $0,32\text{g/g}$  (BT1) para  $0,86\text{g/g}$  e  $1,30\text{g/g}$  nas culturas BT4 e BT5, respectivamente. Isto indica claramente que o ácido graxo foi utilizado para formação das células considerando o baixo consumo de substrato.

Para comprovar o consumo de ácido oléico, os valores de  $Y_{Xr/S}$  foram calculados e expressos em Cmol/Cmol (tabela 3.5). Considerando apenas o consumo de glicose, o valor de  $Y_{Xr/S}$  foi de 1,06 e 1,6 CmolX/CmolS para as culturas BT4 e BT5, respectivamente. Estes valores foram muito elevados se comparados ao valor teórico de 0,6CmolX/CmolS (ROELS, 1983). Incluindo-se o ácido oléico, estes valores serão 0,46 e 0,55 Cmol/Cmol, respectivamente (tabela 3.5). Portanto a adição de ácido oléico na fase de crescimento celular (BT4/BT5) foi determinante na formação da biomassa.

Comparando os resultados globais de produtividade em células e produtividade em polímeros na cultura controle (BT1) iguais a  $0,37g_{cel}.L^{-1}.h^{-1}$  e  $0,23g_{pol}.L^{-1}.h^{-1}$ , respectivamente, com as culturas com a adição de ácido oléico na fase de crescimento (BT4) iguais a  $0,40g_{cel}.L^{-1}.h^{-1}$  e  $0,26g_{pol}.L^{-1}.h^{-1}$ , percebe-se que o ácido oléico foi utilizado para produção de células nesta fase, sem nenhum efeito sobre a produção do polímero (tabela 3.3).

O aumento percentual da produção de biomassa residual foi de 50%, ratificando os resultados obtidos em frascos agitados. Não há relatos na literatura quanto ao uso de ácido graxo na fase de crescimento como suplemento nutricional. Os estudos existentes substituem totalmente a fonte de carbono (glicose/frutose) pelo ácido graxo ou óleo vegetal. A substituição tem levado a obtenção de baixos valores para velocidade específica de crescimento (KAHAR *et al.*, 2004).

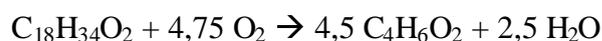
*b) Efeito da adição de ácido oléico na fase de produção (BT4 e BT5)*

A tabela 3.3 mostra a concentração final de P(3HB) igual a 7g/L (BT4) e 13g/L (BT5) nos cultivos sem suplementação e com suplementação de ácido oléico, respectivamente. Considerando que a biomassa foi igual a 16,5g/L no ensaio sem suplementação e 17,5g/L no ensaio com suplementação de ácido graxo, pode-se concluir que com adição de ácido oléico o fluxo de carbono foi canalizado para produção do polímero. Esta constatação é confirmada pelos valores de  $Y_{P(3HB)/S}$  e  $P_{P(3HB)}$  igual a 0,35g/g e  $0,43g.L^{-1}.h^{-1}$  (BT5), respectivamente, o que

representa um aumento de 75% e 65% nesses parâmetros em relação à cultura sem ácido oléico adicionado na fase de produção (BT4).

Comparando a cultura BT5 cuja suplementação de ácido oléico ocorreu nas duas fases de cultivo, com a cultura controle (BT1), observou-se um aumento percentual de 90% e 87% na produtividade em células e na produtividade em polímero, respectivamente.

Como descrevem Akiyama *et al.* (2003), a molécula de glicose é metabolizada pela via bioquímica Entner-Doudoroff para formar duas moléculas de acetil-CoA (que serão convertidas em unidades de 3HB) liberando duas moléculas de CO<sub>2</sub>. Por sua vez, a molécula de ácido graxo (ácido linoleico) poderá sofrer repetidos ciclos de β-oxidação através do qual 9 moléculas de acetil-CoA são produzidas, o que pode, estequiometricamente, resultar na formação de 4,5 unidades monoméricas de 3HB.



Embora a estratégia utilizada nestes ensaios não tenha sido utilizada por outros pesquisadores, a adição de ácido oléico na fase de produção já foi estudada anteriormente.

Squiro (2003) observou cerca de 11% de aumento na produção do copolímero (P(3HB-co-3HV)) com pulso de 0,3g/L de ácido oléico na fase de produção em relação à cultura sem suplementação, com aumento na fração de 3HB em detrimento da fração 3HV. Resultados similares foram obtidos por Marangoni (2000) cujo aumento foi de 10% no conteúdo do polímero quando *Ralstonia eutropha* cresceu em açúcar invertido e ácido propiônico suplementado com ácido oléico.

Naylor e Wood (1999) reportaram fatores de conversão de substrato em polímero da ordem de 0,64 a 0,74 g<sub>pol</sub>/g<sub>sub</sub> na produção de P(3HB-co-3HV) a partir de óleo de milho ou óleo de colza e ácido propiônico em culturas de *R. eutropha*.

Com base na concentração final de P(3HB) e na massa seca final, foi possível obter a porcentagem de polímero acumulado no interior da célula. O acúmulo de P(3HB) (tabela 3.4) passou de 40% (BT4) para 63% (BT5) com adição de ácido graxo na fase de produção.

Dalcanton (2006) avaliou o efeito da suplementação de óleo de soja em cultivos de *Ralstonia eutropha* a 30°C e 35°C, tendo glicose como fonte de carbono. Os cultivos suplementados com óleo de soja apresentaram maior produção de biopolímero, com acúmulo de P(3HB) no interior da célula que passou de 32% para 44% a 30°C e 32% a 45% a 35°C com e sem suplementação respectivamente.

Fukui e Doi (1998) utilizaram ácido oléico e vários óleos vegetais (1%) no cultivo da linhagem selvagem de *Alcaligenes eutrophus*. Embora os pesquisadores tenham obtido uma baixa concentração celular (4,1g/L) após 72h de cultivo a 30°C na presença de ácido oleico, o conteúdo de PHA acumulado atingiu 82% de massa seca da célula.

A fim de avaliar o uso de óleo vegetal no cultivo de P(3HB) por *Ralstonia eutropha*, ácido oléico foi substituído por óleo de canola (BT6). A análise do óleo de canola mostrou que havia 75% de ácido oléico em sua composição. Esta porcentagem foi utilizada para o cálculo do equivalente em ácido oléico a ser utilizado. A quantidade de ácido oléico adicionado foi equivalente à 3,0g/L de ácido oléico sendo adicionado no início da fase de crescimento e 3,0g/L no início da fase de produção (cultura BT5).

Pela tabela 3.3 observa-se que o uso de óleo vegetal proporcionou a melhor quantidade de biomassa formada. Os valores de produtividade global em células e em polímero, substrato consumido, fator de conversão de substrato em células e em polímero foram semelhantes aos obtidos utilizando-se ácido oléico nas mesmas condições.

Rodrigues (2005) observou que a suplementação com óleo de soja (concentração equivalente a 0,3g/L em ácido oléico) levou à produção de mais de 10% em polímero em relação à cultura não suplementada.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que, com a adição de uma quantidade 10 vezes maior de ácido oléico (3,0 g/L) ou equivalente em óleo de canola, pode aumentar em 100% a quantidade de P(3HB) produzida, se adicionada nas duas fases.

### **Considerações finais do capítulo**

Após a realização dos trabalhos deste capítulo foi possível obter algumas informações importantes com respeito à síntese de P(3HB) a partir de *Ralstonia eutropha*.

- ❖ Concentrações crescentes de ácido oléico, a 30°C, em condições balanceadas, em frascos agitados, favorecem a velocidade específica máxima de crescimento e produtividade em células.
- ❖ Em condições não balanceadas, em frascos agitados, a temperatura de 37°C favorece a produção do polímero e crescimento celular.
- ❖ Em biorreator foi observada uma maior produção de células a 37°C.
- ❖ A mudança de temperatura de 30°C para 37°C na fase de produção não acarretou variação em nenhum dos parâmetros avaliados.
- ❖ A adição de ácido oléico nas fases de crescimento e produção proporcionou a maior produtividade e conversão de substrato em polímero.
- ❖ O ácido oléico adicionado na fase de crescimento proporcionou um aumento percentual na produção de biomassa (residual) de 50%.
- ❖ Com a adição de 3,0g/L de ácido oléico ou equivalente em óleo de canola, o aumento da quantidade de P(3HB) produzida pode chegar a 100%, se adicionado nas duas fases.

*A vida se tornaria insuportável se não  
nos proporcionasse mudanças.*

(Joseph Murphy)

## **Capítulo 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

### **CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE P(3HB) OBTIDOS POR *Ralstonia eutropha* COM O USO DE ÁCIDO OLÉICO COMO SUPLEMENTO NUTRICIONAL**

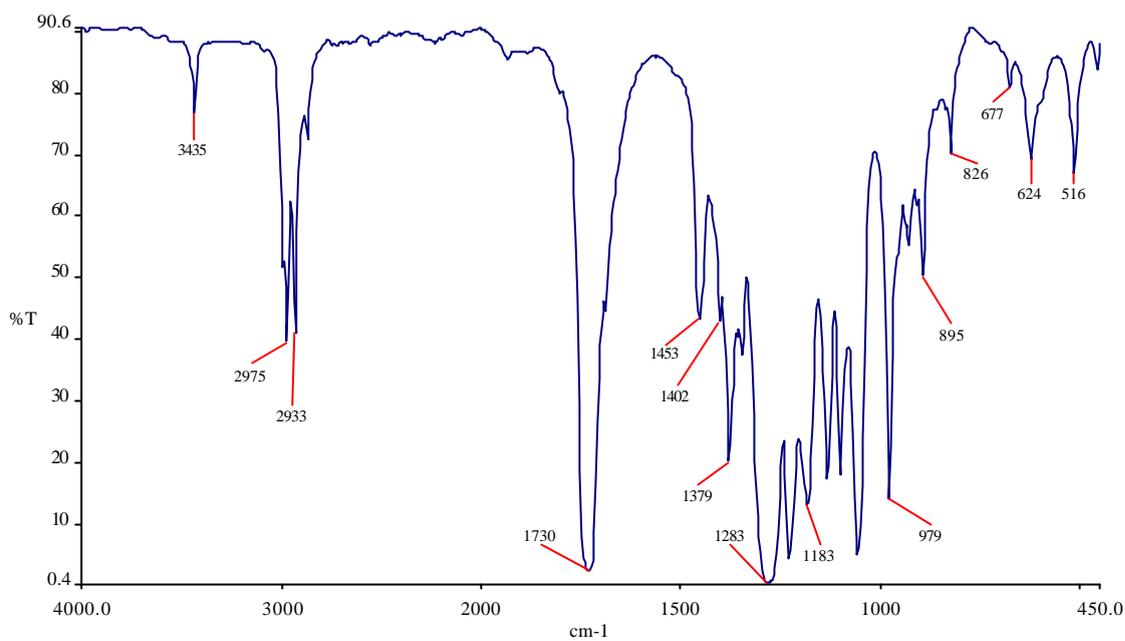
Após a síntese de P(3HB) a partir do cultivo de *Ralstonia eutropha* em diferentes concentrações de ácido oléico (0 a 3g/L), o P(3HB) acumulado no interior da célula foi extraído e na forma de filmes foi caracterizado quanto ao grau de cristalinidade, estabilidade térmica e grupamentos funcionais. O polímero obtido a partir do cultivo considerado controle, ou seja, sem adição de ácido oléico, foi comparado ao obtido pela PHB Industrial.

## 4.1 Comparação do polímero obtido a partir do cultivo de *Ralstonia eutropha* (controle) com o polímero industrial

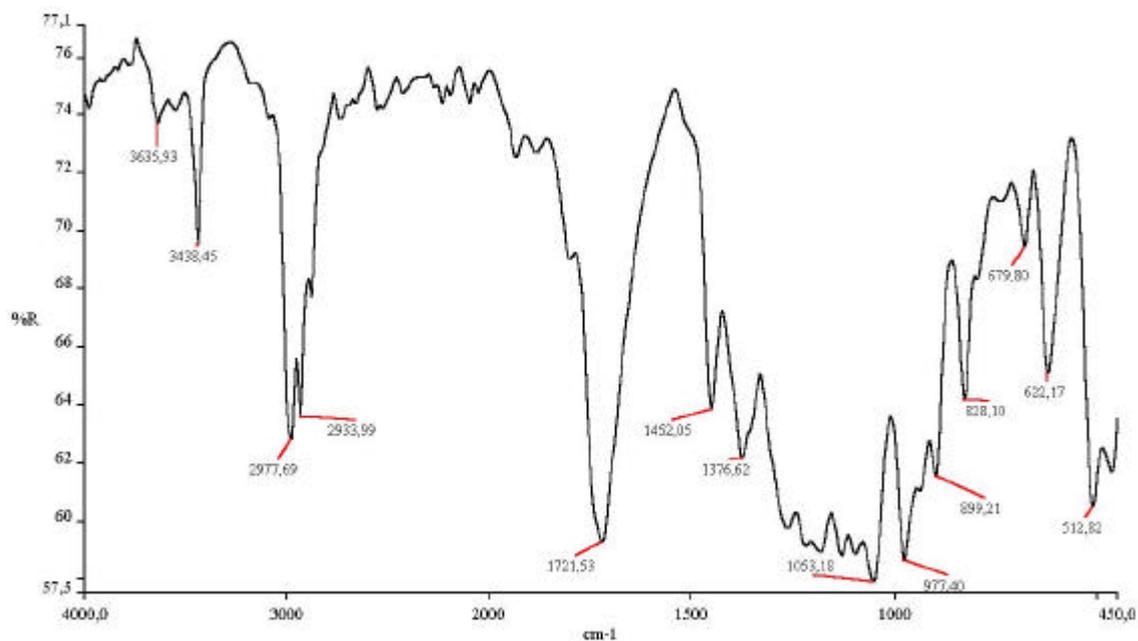
### 4.1.1 Espectrometria na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT- IR)

A espectrometria no infravermelho constitui uma valiosa técnica para estudar os polímeros, estimando as interações e mudanças na morfologia dos componentes, pois combina as interações químicas e a estrutura conformacional da molécula (SPIER, 2005).

As figuras 4.1 e 4.2, a seguir, apresentam os espectros de FT-IR para o polímero obtido por *Ralstonia eutropha* e o produzido industrialmente, respectivamente. Foram observadas, na figura 4.1, as bandas características de P(3HB), tais como as deformações axiais da carbonila (C=O) em  $1.737\text{cm}^{-1}$ , pico atribuído à vibração da carbonila do grupo éster (BIN WU e LENZ, 1988 *apud* SPIER, 2005) e de C-C em  $978\text{cm}^{-1}$ , ambos evidentes também no espectrômetro do polímero industrializado (figura 4.2). A banda de deformação angular simétrica no plano dos grupos  $\text{CH}_3$  em  $1.380\text{cm}^{-1}$  e a banda típica da conformação helicoidal das cadeias a  $1.227\text{cm}^{-1}$  estão de acordo com os picos descritos por Galego *et al.* (2000). Segundo Quental e Felisberti (2001) *apud* Formolo *et al.* (2003) as bandas  $1.134\text{cm}^{-1}$  e  $1.187\text{cm}^{-1}$  são atribuídas, respectivamente, aos estiramentos simétricos e assimétricos do grupo C-O-C. Galego *et al.* (2000) relataram que na faixa  $1.228\text{cm}^{-1}$  a  $1.279\text{cm}^{-1}$  as bandas são características da ligação C-O-C.



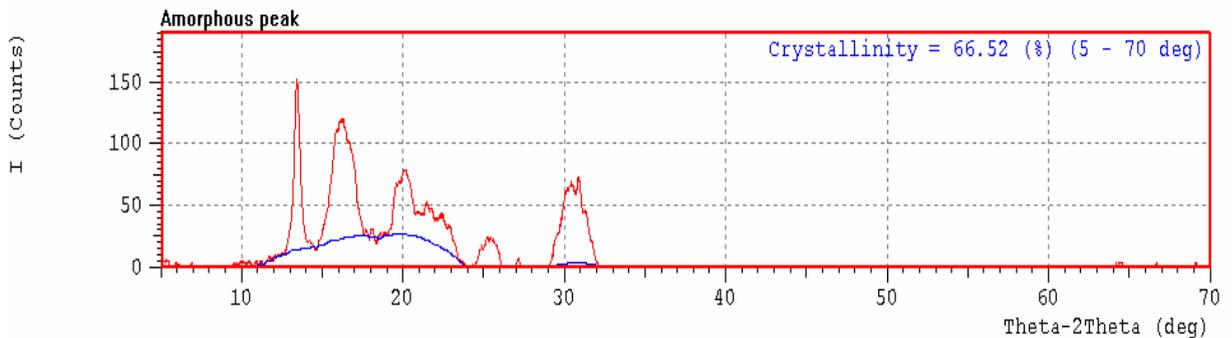
**Figura 4.1** Espectro de FT-IR para o polímero sintetizado por *R. eutropha* sem adição de ácido oléico



**Figura 4.2.** Espectro de FT-IR para o polímero obtido industrialmente

### 4.1.2 Difração de raio-X

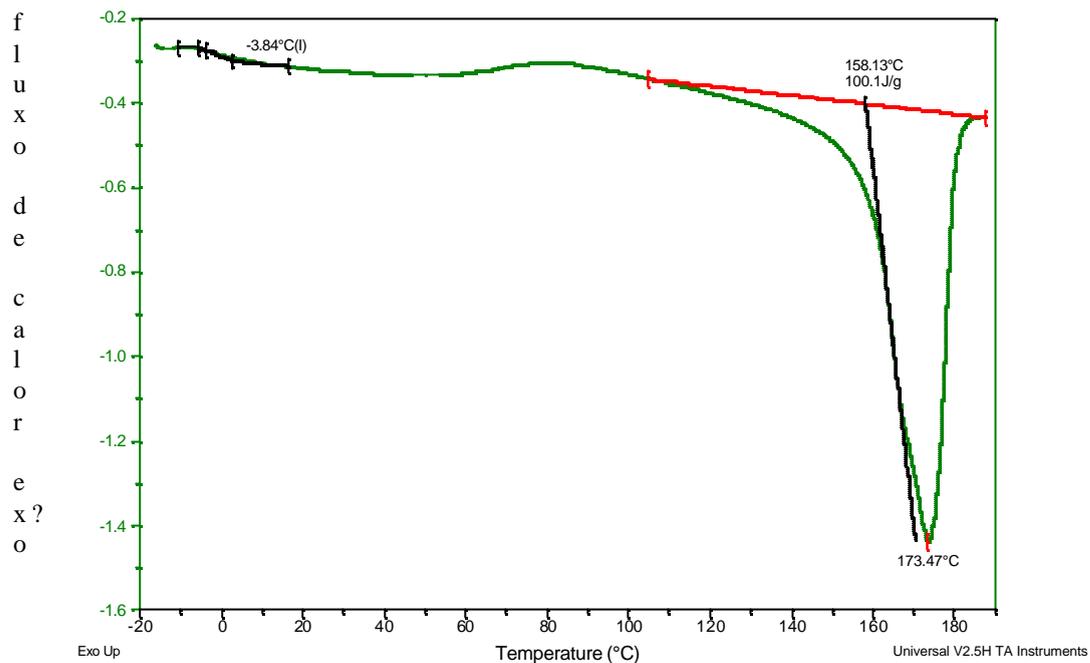
O perfil de difração de raios-X para o polímero sintetizado por *Ralstonia eutropha* é apresentado na figura 4.3. Observaram-se picos de difração em  $2\theta$  iguais a 13,5; 16; 20; 21,5; 22,5; 25,5; 27 e 31, típicos do polímero P(3HB) semicristalino, com grau de cristalinidade igual a 66,5%. O perfil de difração foi similar aos padrões apresentados por Galego *et al.* (2000) e Yoshie e Inoue (2001).



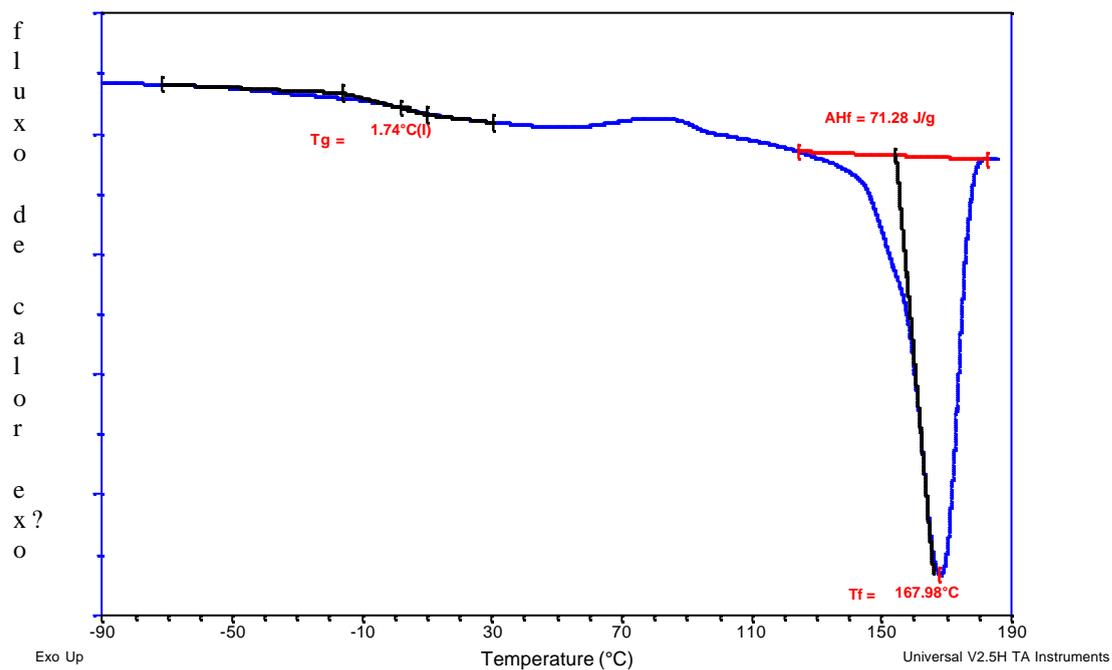
**Figura 4.3** Difratoograma de raios-X do polímero sintetizado por *Ralstonia eutropha*

### 4.1.3 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

As figuras 4.4 (a e b) apresentam os termogramas obtidos das análises de DSC a que foram submetidos os polímeros sintetizados por *Ralstonia eutropha* e da PHB Industrial.



(a)



(b)

**Figura 4.4** Curvas de DSC para (a) polímero sintetizado por *Ralstonia eutropha* sem adição de ácido oléico e (b) polímero obtido industrialmente para o segundo aquecimento.

Como pode ser observado na tabela 4.1, a temperatura de fusão ( $T_m$ ) foi de 174°C e 168°C para o polímero obtido por *Ralstonia eutropha* e para o polímero obtido industrialmente, respectivamente. A  $T_m$  do polímero sintetizado foi semelhante à apresentada por Dalcanton (2006), que obteve 176°C e 176°C para o polímero cultivado de *R. eutropha* e para PHB industrial. Lee (1996b) ressalta que um dos entraves para o uso comercial de P(3HB) é que ele se decompõe a aproximadamente 200°C, temperatura ligeiramente superior ao seu ponto de fusão. No entanto, Duarte (2004) verificou que nos estudos por tempo de indução para a reação de oxidação (OIT) não foi constatada nenhuma degradação térmica do P(3HB) a 200°C por 120min. Os resultados sugeriram que a melhor temperatura de processamento para o P(3HB) deve ser inferior a 200°C, pois acima dessa temperatura a velocidade de degradação tem um aumento pronunciado.

**Tabela 4.1** Valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ), entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), obtidos por DSC (2<sup>o</sup> aquecimento) das amostras de P(3HB) sintetizado por *Ralstonia eutropha* sem adição de ácido oléico (controle) e obtido industrialmente

Condição	$T_g$ (°C)	$T_c$ (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)	$\%c$ (%)
0g/L (controle)	- 4,0	----	----	174	100	70
PHB Industrial	2,0	----	----	168	71	50

Sudesh e colaboradores (2000) mostraram que as propriedades físicas e térmicas dos copolímeros de PHAs podem ser reguladas com a variação da estrutura molecular e a composição do copolímero. O homopolímero P(3HB) é um material relativamente rígido e quebradiço (LEE, 1996b). A introdução de monômeros de HA na cadeia de P(3HB) melhora as propriedades mecânicas do material. Os poliésteres da família dos PHAs oferecem uma grande variedade de materiais poliméricos exibindo várias propriedades, desde polímeros muito cristalinos até elastômeros.

Desta forma, a incorporação de outros monômeros na molécula de P(3HB) gera copolímeros com  $T_m$ s mais baixas podendo ser facilmente processados (WILLIANS e MARTIN, 2001). Os polihidroxiálcanoatos se comportam como materiais termoplásticos com  $T_m$  variando entre 50°C e 180°C (SUDESH *et al.*, 2000). A temperatura de fusão encontrada por Galego *et al.* (2000) para o copolímero poli(3-hidroxi butirato-*co*-24% hidroxivalerato) foi igual a 129°C. Holmes (1987) apresenta a diminuição da  $T_m$  (179°C para 137°C) com o aumento da fração de 3HV de 0mol% para 25mol%.

A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), obtida a partir dos termogramas de DSC, é o valor médio da faixa de temperatura que durante o aquecimento de um material polimérico, de uma temperatura muito baixa para valores mais altos, permite que as cadeias poliméricas da fase amorfa adquiram mobilidade (com possibilidade de mudança conformacional). Abaixo da  $T_g$  o polímero não tem energia interna suficiente para permitir o deslocamento de uma cadeia com relação à outra (CANEVAROLO, 2004). Os valores obtidos para  $T_g$  foram -4°C para o polímero sintetizado por *Ralstonia eutropha* e 2°C para o obtido industrialmente. A  $T_g$  do P(3HB) puro varia de -5°C a 5°C (ANDERSON e DAWES, 1990). A incorporação de unidades HV também diminui a  $T_g$  como descrito por Holmes (1987), formando um material mais flexível, com melhoria nas propriedades mecânicas.

Nas curvas de DSC, as áreas sob os picos são tomadas como proporcionais às variações de entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ). Através da relação entre o valor medido e o valor teórico de uma situação ideal, em que se supõe o polímero como 100% cristalino, foi possível calcular o grau de cristalinidade ( $\chi_c$  %) do P(3HB) (item 2.6.1 capítulo 2). Segundo Tsujie e Ikada (1996), o valor teórico para entalpia de fusão do P(3HB) é 142 J.g<sup>-1</sup>. Dessa forma, o grau de cristalinidade do polímero produzido por *Ralstonia eutropha* foi de 70%, enquanto que o grau de cristalinidade do P(3HB) da PHB Industrial foi igual a 50%. Isso demonstra que a fração de cristais desses polímeros estão totalmente organizados, conferindo a característica de material

quebradiço, o que diminui suas aplicações industriais. Uma alternativa para melhorar essa característica é a copolimerização com outros hidrocarbonetos na cadeia do P(3HB), como por exemplo, o 3-hidroxivalerato (3HV). Há vários relatos na literatura que descrevem melhores propriedades do P(3HB) com a incorporação dos monômeros (MERGAERT *et al.*, 1993; GALEGO *et al.*, 2000; MADDEN *et al.*, 2000). Savenkova *et al.* (2000) avaliaram as propriedades mecânicas e térmicas de filmes de poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxivalerato), P(3HB-co-3HV), com diferentes composições. O aumento da fração de 3HV de 0mol% para 20mol% levou a uma diminuição na  $T_g$  de 4°C para -6°C; na  $T_m$  de 180°C para 116°C e da  $\rho_c$  (%) de 63% para 31%.

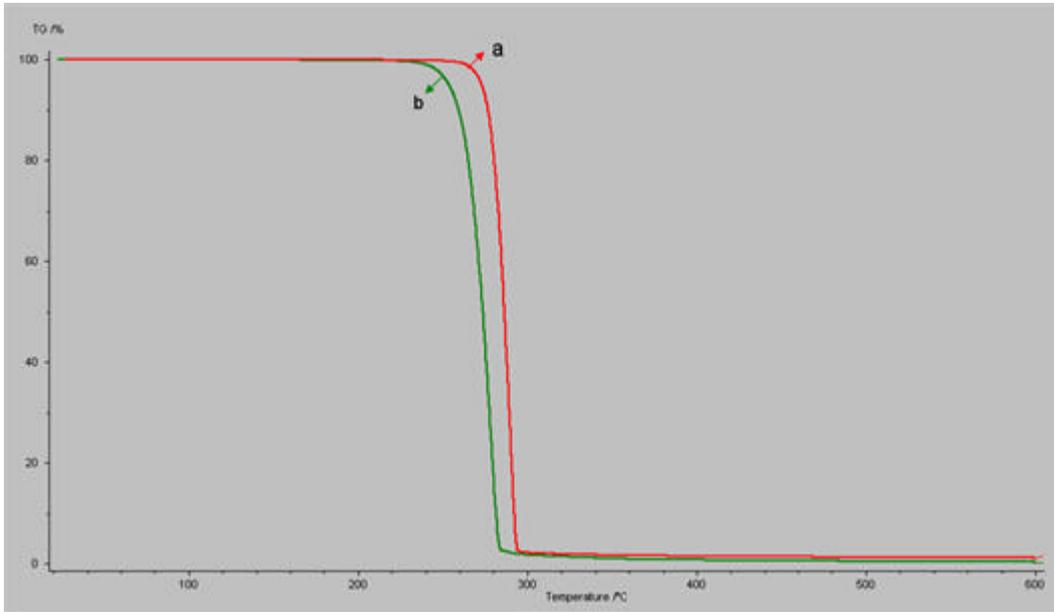
Outra alternativa para melhorar as propriedades físicas e térmicas do P(3HB), é a obtenção de blendas com outros polímeros biodegradáveis, tais como ésteres celulósicos, poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) (VOGELSANGER *et al.*, 2003). O capítulo 6 deste trabalho descreve as características obtidas para as blendas de P(3HB)/PCL em várias composições.

Outras possibilidades que também contribuem para melhorar as características mecânicas do P(3HB) são a síntese de P(3HB) atático (LEE, 1996b) ou a orientação das cadeias moleculares, com geração de conformação em zigzag e uma estrutura em *network*, formando fibrilas e cristais lamelares (IWATA, 2005).

#### 4.1.4 Análise termogravimétrica (TGA)

A figura 4.5 apresenta as curvas termogravimétricas para o P(3HB) sintetizado por *Ralstonia eutropha* e o polímero industrializado. Ambos os polímeros sofrem apenas um estágio de perda de massa. A temperatura de início de degradação térmica ( $T_i$ ) para o polímero obtido por *Ralstonia eutropha* é de 280°C, enquanto o P(3HB) industrializado já inicia esse estágio em aproximadamente 265°C. A partir da primeira derivada da curva de degradação térmica foi possível obter os dados da temperatura máxima de degradação ( $T_{pico}$ ), que foi de

290°C para o P(3HB) sintetizado por *Ralstonia eutropha* e 274°C para o polímero industrializado. Por meio desses dados conclui-se que o P(3HB) sintetizado pela *Ralstonia eutropha* foi cerca de 6% mais estável termicamente, o que é vantajoso em termos industriais.



**Figura 4.5** Curvas termogravimétricas para (a) polímero sintetizado por *Ralstonia eutropha* e (b) polímero obtido industrialmente

**Tabela 4.2.** Dados de temperatura de início de degradação ( $T_i$ ) e temperatura máxima de degradação ( $T_{pico}$ ) e percentual de perda de massa obtidos por TGA para os polímeros sintetizados por *Ralstonia eutropha* sem adição de ácido oléico (controle) e o P(3HB) obtido industrialmente

Condição	$T_i$ (°C)	$T_{pico}$ (°C)	Perda de massa (%)
Controle (0 g/L)	280	290	98,43
PHB Industrial	265	274	98,95

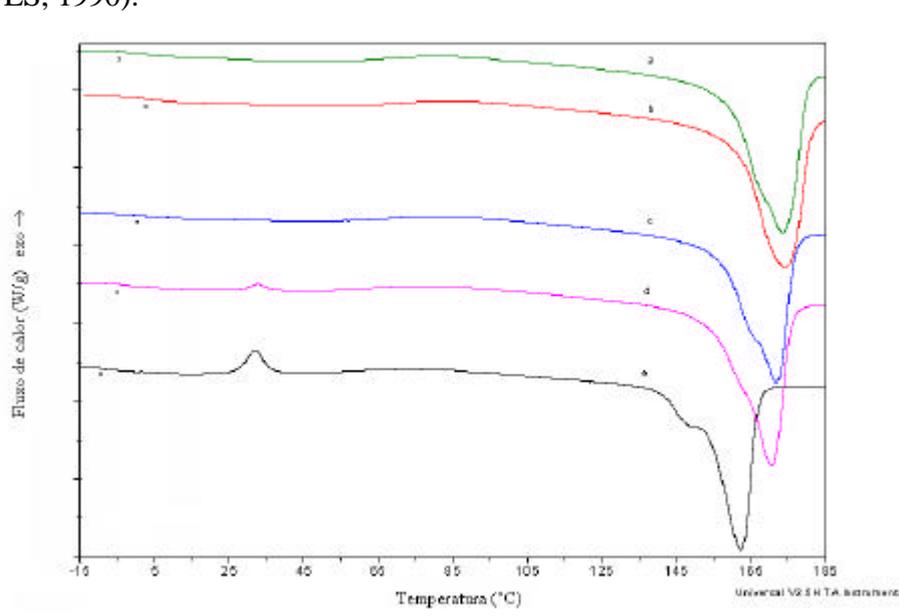
Segundo ROSA *et al.* (1999), durante o processamento, o polímero pode ser fundido e moldado no formato desejado e, portanto, pode sofrer certa degradação causada pela temperatura e pela força mecânica às quais o material é submetido. A degradação induzida por cisalhamento e a degradação térmica, advindas do processamento, podem causar alterações na morfologia e nas características mecânicas do material, e com isso sua vida útil é abreviada.

## 4.2 Caracterização do P(3HB) sintetizado em diferentes concentrações de ácido oléico

A influência do ácido oléico nas propriedades térmicas foi avaliada pelas técnicas de DSC e TGA. Para as análises realizadas em DSC, não houve diferença significativa para os parâmetros analisados ( $T_g$ ,  $T_c, \Delta H_c$ ,  $T_m, \Delta H_m$ ) para o 1º e 2º aquecimento, de forma que os resultados foram apresentados para o 2º aquecimento.

### 4.2.1 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

A figura 4.6 ilustra as curvas de DSC das amostras de P(3HB) em função da concentração de ácido oléico e a tabela 4.3 apresenta os valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ), entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ) obtidos por DSC (1º aquecimento) e temperatura de fusão ( $T_m$ ) e entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), obtidos por DSC (1º e 2º aquecimento) das amostras de P(3HB) em função do teor de ácido oléico. Notou-se que a  $T_g$  das amostras se encontra na faixa entre  $-5$  a  $3^\circ\text{C}$ , característica do P(3HB) (ANDERSON e DAWES, 1990).



**Figura 4.6** Curvas de DSC das amostras de P(3HB) (2º aquecimento), em função do teor de ácido oléico, mostrando a  $T_g$  (\*): a) 0 (controle); b) 0,3g/L; c) 0,9g/L; d) 1,5g/L; e) 3,0g/L

**Tabela 4.3.** Valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ), entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), obtidos por DSC (1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> aquecimento) das amostras de P(3HB) sintetizadas por *Ralstonia eutropha* com diferentes teores de ácido oléico (AO)

Condição	$T_g$ (°C)		$T_c$ (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)		$T_m$ (°C)		$\Delta H_m$ (J/g)		$\%c$ (%)
	2 <sup>o</sup> Aquec	2 <sup>o</sup> Aquec		2 <sup>o</sup> Aquec	1 <sup>o</sup> Aquec	2 <sup>o</sup> Aquec	1 <sup>o</sup> Aquec	2 <sup>o</sup> Aquec	2 <sup>o</sup> Aquec	
0 g/L (controle)	-4	----	----	----	174	173	94	100	70	
0,3g/L AO	2	----	----	----	177	174	89	94	66	
0,9g/L AO	0	----	----	----	173	172	83	88	62	
1,5g/L AO	-5	33	1	173	170	89	91	63		
3,0g/L AO	-10	32	5	168	149 162	77	80	52		

Com a adição de 0,3g/L de ácido oléico (AO), houve inicialmente um aumento da  $T_g$  em 6°C, seguido de uma gradual diminuição dessa temperatura com valores crescentes de ácido oléico. Na concentração de 3,0g/L de AO ocorreu, no entanto, uma maior variação para a amostra na qual a  $T_g$  ficou em -10 °C, indicando um polímero mais flexível. Entretanto, esse valor encontra-se fora da faixa de  $T_g$  para o P(3HB) geralmente encontrado na literatura (-5°C a 5°C) (ANDERSON e DAWES, 1990).

Da mesma forma, como pode ser observado pela tabela 4.3, com o aumento da concentração do ácido oléico houve um deslocamento discreto e gradual da  $T_m$  do polímero para temperaturas inferiores até adição de 1,5g/L de AO. Entretanto, observou-se um decréscimo em relação à amostra controle de aproximadamente 11°C (2<sup>o</sup> aquecimento) quando 3,0g/L de AO foram acrescentados, bem como o aparecimento de um ombro na temperatura de fusão bem inferior, a 149°C (figura 4.6 (e)), o que indica diferentes arranjos cristalinos.

Esses resultados estão de acordo com Akiyama *et al.* (1992), que encontrou um decréscimo na  $T_m$  de 179°C para 116°C quando ácido oléico foi utilizado no cultivo de *Alcaligenes* sp AK 201 como única fonte de carbono na concentração de 3,0g/L. Porém essa  $T_m$  difere dos valores de  $T_m$  geralmente encontrados na literatura para o P(3HB)

(JENDROSSEK *et al.*, 1996; SUDESH *et al.*, 2000). A obtenção de polímeros com temperaturas de fusão mais baixas é interessante do ponto de vista industrial, pois melhora a processabilidade do material.

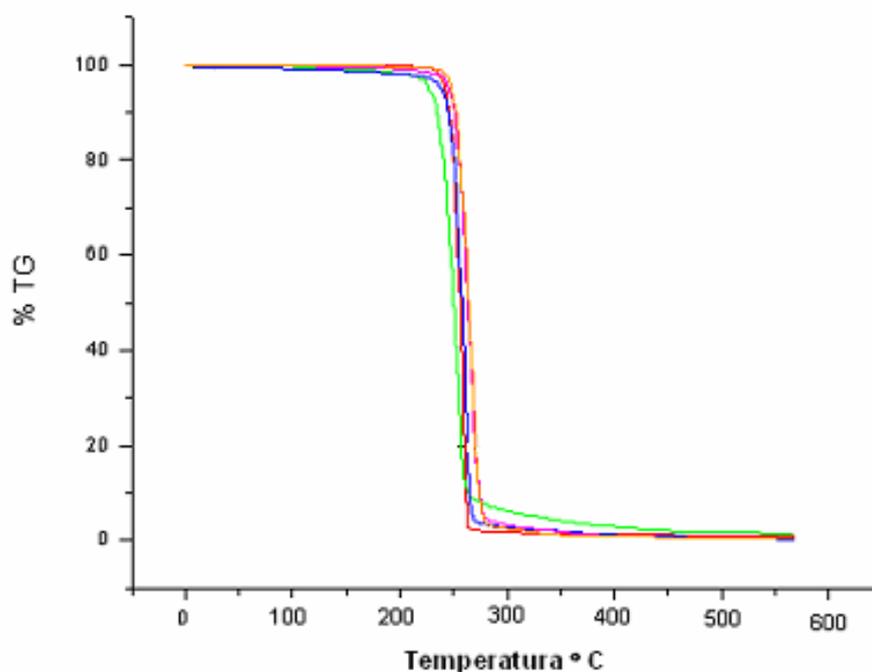
Canevarolo (2004) relata que quanto maior a fração volumétrica cristalina presente no polímero, tanto mais sua curva se afasta do comportamento do polímero amorfo. Baixos valores para entalpia de fusão indicam uma maior fração da fase amorfa nos polímeros (MADDEN *et al.*, 2000). Observou-se na tabela 4.3 que concentrações crescentes de ácido oléico diminuiram a entalpia de fusão e conseqüentemente o grau de cristalinidade do polímero, aumentando sua fração amorfa. Um decréscimo de cerca de 25% no grau de cristalinidade em relação à amostra controle foi determinado quando se adicionou 3,0g/L de AO ao meio de cultura para síntese do polímero por *Ralstonia eutropha*. Com o acréscimo de até 1,5g/L de AO, a diminuição da cristalinidade não foi expressiva.

Outra observação interessante foi o aparecimento de um pico de cristalização nos polímeros sintetizados com 1,5 e 3,0g/L de ácido oléico. À medida que a temperatura aumenta, ocorre uma mobilidade gradual das cadeias, permitindo que elas se reorganizem formando novos cristais. É de se esperar, portanto, que, quanto maior a fração amorfa do polímero, maior seja a entalpia de cristalização, como a encontrada nos filmes sintetizados com 1,5 e 3,0g/L de ácido oléico (tabela 4.3). Aumentando ainda mais a temperatura, a energia do sistema atinge o nível necessário para vencer as forças intermoleculares secundárias entre as cadeias da fase cristalina, destruindo a estrutura regular do empacotamento mudando do estado borrachoso para o estado viscoso (totalmente fundido).

#### 4.2.2 Análise termogravimétrica (TGA)

A figura 4.7 mostra as curvas termogravimétricas dos filmes de P(3HB) em função da concentração de ácido oléico, enquanto a tabela 4.4 apresenta os dados de temperatura de início de degradação ( $T_i$ ) e temperatura máxima de degradação ( $T_{pico}$ ) obtidos a partir da primeira derivada das curvas de TGA.

De 0g/L até 1,5g/L de ácido oléico, não se observou uma variação muito pronunciada na  $T_i$  do P(3HB). Entretanto, com a adição de 3,0g/L de AO houve um decréscimo de cerca de 10°C na estabilidade térmica do polímero. Esses resultados são extremamente importantes, pois um dos maiores problemas relacionados ao P(3HB) é a sua baixa estabilidade térmica, como mencionado anteriormente. O resultado obtido para o P(3HB) com 3,0g/L de AO requer outros estudos, pois essa temperatura se aproxima da temperatura de processamento do material.



**Figura 4.7.** Curvas termogravimétricas do P(3HB) sintetizado por *Ralstonia eutropha* em função da concentração do ácido oléico comparadas com o P(3HB) controle (sem ácido oléico)

**Tabela 4.4.** Dados de temperatura de início de degradação ( $T_i$ ) e temperatura máxima de degradação ( $T_{pico}$ ) obtidos por TGA para os polímeros sintetizados por *Ralstonia eutropha* em função da concentração de ácido oléico (AO)

Condição	$T_i$ (°C)	$T_{pico}$ (°C)
Controle (0 g/L)	280	290
0,3g/L AO	284	298
0,9g/L AO	283	296
1,5g/L AO	280	292
3,0g/L AO	270	284

### Considerações finais do capítulo

Após a realização dos trabalhos deste capítulo, foi possível obter algumas informações importantes com respeito à caracterização térmica, grupamentos funcionais e grau de cristalinidade de P(3HB) sintetizado a partir de *Ralstonia eutropha*.

- ❖ O polímero sintetizado por *R. eutropha*, apresentou o padrão típico de P(3HB), confirmado por raio- X.
- ❖ O polímero foi 15°C mais estável termicamente do que o P(3HB) industrial com  $T_{pico}$  em 290°C e com um único estágio de perda de massa, apresentando grau de cristalinidade 35% superior em relação ao PHB industrial.
- ❖ O aumento da concentração de ácido oléico levou a uma diminuição da entalpia de fusão e consequentemente no grau de cristalinidade. A  $T_m$  praticamente não variou para as concentrações entre 0 e 1,5g/L de AO. No entanto com 3,0g/L a  $T_m$  diminuiu 11°C em relação à amostra controle (sem ácido oléico), bem como apresentou um início de fusão dos cristalitos à temperatura de 149°C. Não houve diferença na degradação com relação à variação de ácido oléico.

*Menor que meu sonho eu não posso ser.*

(Lindolf Bell)

## Capítulo 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### BIODEGRADAÇÃO EM SOLO DOS FILMES DE P(3HB) OBTIDO POR *Ralstonia eutropha* COM O USO DE ÁCIDO OLÉICO COMO SUPLEMENTO NUTRICIONAL

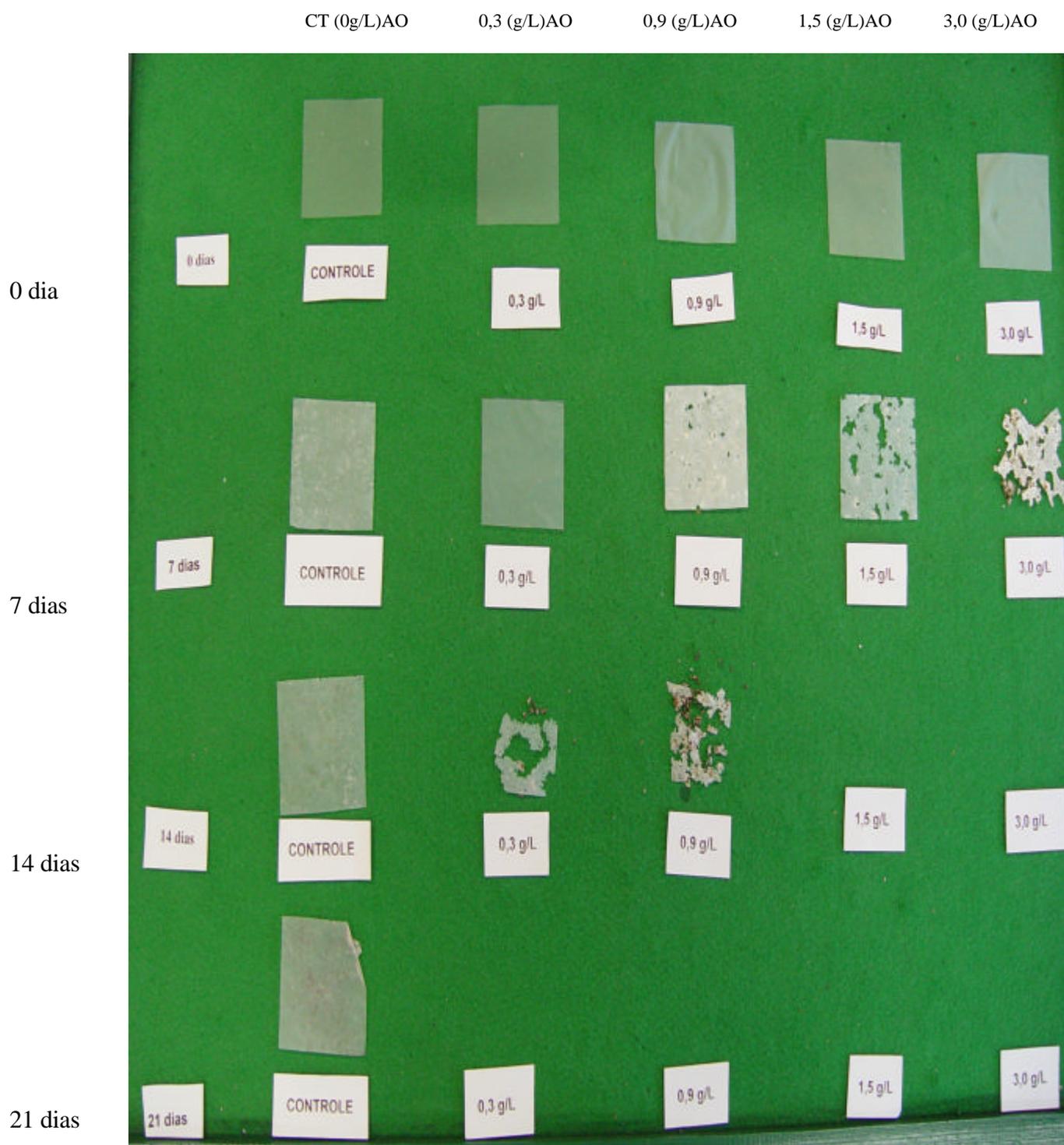
Os impactos ambientais negativos causados pelo descarte de polímeros convencionais direcionaram os estudos para o desenvolvimento de polímeros biodegradáveis. A principal vantagem em usar o P(3HB) como um material termoplástico é a sua biodegradabilidade. Isso ocorre, pois muitos microrganismos secretam enzimas que podem rapidamente despolimerizar a cadeia de P(3HB). Este capítulo apresenta os resultados de caracterização após a biodegradação em solo dos filmes sintetizados com diferentes concentrações de ácido oléico a partir de *Ralstonia eutropha*. O acompanhamento da degradação dos filmes foi realizado por meio de análise visual, das propriedades térmicas e do grau de cristalinidade.

## 5.1 Caracterização dos polímeros de P(3HB) após biodegradação em solo

Para os estudos de biodegradação os filmes foram obtidos a partir da extração do polímero intracelular acumulado pela *Ralstonia eutropha* durante seu cultivo em diferentes concentrações de ácido oléico. Consistiu, portanto, em uma degradação extracelular. A diferenciação entre degradação extra e intracelular é necessária porque o polihidroxibutirato *in vivo* e fora da bactéria encontra-se em dois estados biofísicos distintos. O P(3HB) intracelular (nativo) possui alta massa molecular e apresenta-se no estado amorfo, com a conformação das cadeias desordenada e altamente móveis. Na degradação extracelular, após a morte celular ou a extração intencional do P(3HB) da célula, a camada superficial do grânulo é danificada ou perdida (SUDESH *et al.*, 2000) e as cadeias do poliéster tendem a adotar uma conformação helicoidal ordenada e desenvolver a fase cristalina. A partir desse momento é que o P(3HB) se torna uma fonte exógena de carbono/energia para outros microrganismos que não são necessariamente os mesmos que acumulam o polímero. A capacidade de degradar o P(3HB) depende da secreção de despolimerases específicas que são carboxiesterases (EC 3.1.1) e hidrolisam o polímero hidrófobo em monômeros ou oligômeros solúveis. Já a degradação intracelular é uma hidrólise do polímero, que foi armazenado como fonte de carbono/energia pela própria bactéria que o produziu (JENDROSSEK *et al.*, 1996).

### 5.1.1 Análise visual

A figura 5.1 mostra os filmes de P(3HB) sintetizados com diferentes concentrações de ácido oléico (AO) a partir de *Ralstonia eutropha* após 0, 7, 14 e 21 dias de degradação em solo.



**Figura 5.1** Análise visual dos filmes de P(3HB) sintetizados com diferentes concentrações de ácido oléico a partir de *Ralstonia eutropha* após 0, 7, 14 e 21 dias de degradação em solo

A amostra sintetizada sem a presença do ácido graxo (controle) não foi totalmente degradada no período avaliado (21 dias), embora fosse perceptível a formação de colônias na superfície do filme com a presença de orifícios (anexo 5 – figura A 5.1 a e b). Após 7 dias, os filmes sintetizados com 3,0g/L de AO já apresentavam estágio avançado de degradação, sendo que em 14 dias já não foi mais possível encontrar nenhum fragmento no solo. Com 14 dias de degradação ainda foram encontradas amostras dos filmes sintetizados com 0, 0,3 e 0,9g/L de ácido oléico. A análise visual por ser uma técnica qualitativa não fornece informações suficientes para definir a taxa de degradação, não sendo possível afirmar qual concentração degrada mais rápido (0,3 ou 0,9g/L). Dessa forma, pode-se dizer que, aparentemente, a taxa de biodegradação foi maior com o aumento da concentração de ácido oléico durante sua síntese por *Ralstonia eutropha*, podendo ser representada da seguinte forma:

$$3,0\text{g/L AO} > 1,5\text{g/L AO} > 0,9\text{g/L AO} \sim 0,3\text{g/L AO} > 0\text{g/L AO}$$

A biodegradação ocorre pelo crescimento de colônias microbianas (bactérias e fungos) na superfície do filme, que secretam despolimerases capazes de degradar o polímero. Tokiwa e Pranamuda (2002) relatam que a colonização na superfície dos filmes ocorre na região amorfa ou cristalina, indistintamente. No entanto, em culturas líquidas, os microrganismos secretam enzimas que degradam preferencialmente a região amorfa em detrimento da fase cristalina. Os produtos solúveis obtidos da degradação são então absorvidos através da parede celular e metabolizados pela célula. Como resultado da ação enzimática, há a erosão da superfície com formação de orifícios esféricos ou tubulares. Em adição, a massa molar média ( $M_w$ ) do P(3HB) residual no solo não modifica durante a biodegradação. É importante ressaltar que, além da degradação enzimática, ocorre a degradação por hidrólise. No entanto, a

taxa de degradação enzimática dos PHAs pelas despolimerases parece ser maior, por dois ou três graus de magnitude, do que a simples degradação hidrolítica (LI e VERT, 1995).

Como não há relatos na literatura de filmes sintetizados com ácido oléico e biodegradados que possam servir de comparação para os dados obtidos neste trabalho, a comparação foi feita com base em outros polímeros e copolímeros, cuja composição se assemelhe ao P(3HB). Nishida e Tokiwa (1992) estudaram o efeito da estrutura do polímero em amostras de P(3HB) com relação à taxa de degradação e perceberam que o aumento da organização da estrutura, isto é, o aumento da cristalinidade e do módulo de elasticidade agia como agente de repressão, não só da taxa de degradação, como também da colonização das bactérias degradadoras na superfície do filme. No entanto, a presença de uma fase cristalina é essencial para que ocorra a degradação enzimática (SCANDOLA *et al.*, 1997). Essa constatação foi possível após a realização de estudos com P(3HB) sintético (polímero totalmente amorfo) onde se observou uma estabilidade em relação à degradação enzimática decorrente da ausência de domínios cristalinos capazes de fornecer um sítio de ligação para molécula enzimática.

Kunioka *et al.* (1989) estudaram a biodegradação de copoliésteres em solo e lodo ativado e observaram que a temperatura e a entalpia de fusão dos copolímeros diminuíram com o aumento da fração de 4HB, indicando que unidades de 4HB atuam como agentes que danificam a estrutura reticulada do cristal de P(3HB). Embora não tenha havido diferença no grau de cristalinidade dos copolímeros, semelhante ao observado para concentrações de 0 a 1,5g/L de AO neste trabalho, a taxa de degradação foi  $P(3HB-co-9\% 4HB) > P(3HB) \sim P(3HB-co-50\% 3HV)$ , ou seja, o fator determinante para biodegradação foi a composição do polímero. Doi e colaboradores (1989) relataram resultados semelhantes para copolímeros contendo unidades monoméricas de 4HB. Os autores observaram que em lodo aerado ativado,

a 30°C, os filmes de 3HB-co-9% 4HB foram completamente decompostos em 14 dias, enquanto o P(3HB) levou mais de 10 semanas para se decompor.

Diferentes despolimerases parecem ser secretadas por um complexo de populações microbianas que ocorrem no solo, resultando em diferentes taxas de degradação. MERGAERT *et al.* (1993) argumentam que diferenças nas taxas de degradação dos polímeros são devidas às diferenças na cristalinidade, considerando que os copolímeros possuem maiores regiões amorfas. Essa conclusão foi ratificada pelos experimentos de Doi *et al.* (1992) (*apud* Mergaert *et al.*, 1993), que mostraram que a perda de massa foi inversamente proporcional ao grau de cristalinidade. Por outro lado, Doi *et al.* (1990) demonstraram que a taxa de degradação hidrolítica, diferentemente da degradação enzimática, não é dependente da cristalinidade do polímero e sim da sua composição química.

Conclui-se, portanto, que a taxa de degradação dos polímeros varia dependendo do ambiente em que se encontra a amostra (umidade, disponibilidade de nutrientes, pH), aumentando em função da temperatura (Mergaert *et al.*, 1993), do grau de cristalinidade, da massa molar do polímero e da incorporação de unidades monoméricas na cadeia polimérica (SUDESH *et al.*, 2000). O capítulo 4 deste trabalho mostrou que o aumento da concentração de ácido oléico diminuiu a fração da fase cristalina do polímero, o que facilita a sua biodegradabilidade, conforme observado na figura 5.1.

Embora não apresentado na figura 5.1, alguns filmes sintetizados sem adição de ácido oléico foram expostos ao mesmo ambiente de temperatura e umidade conforme descrito no item 2.7.2 – capítulo 2, porém não foram enterradas no solo. Essa amostra foi denominada de “21 controle ambiental” e teve como objetivo verificar a ação do tempo (após 21 dias) em amostras não enterradas em solo.

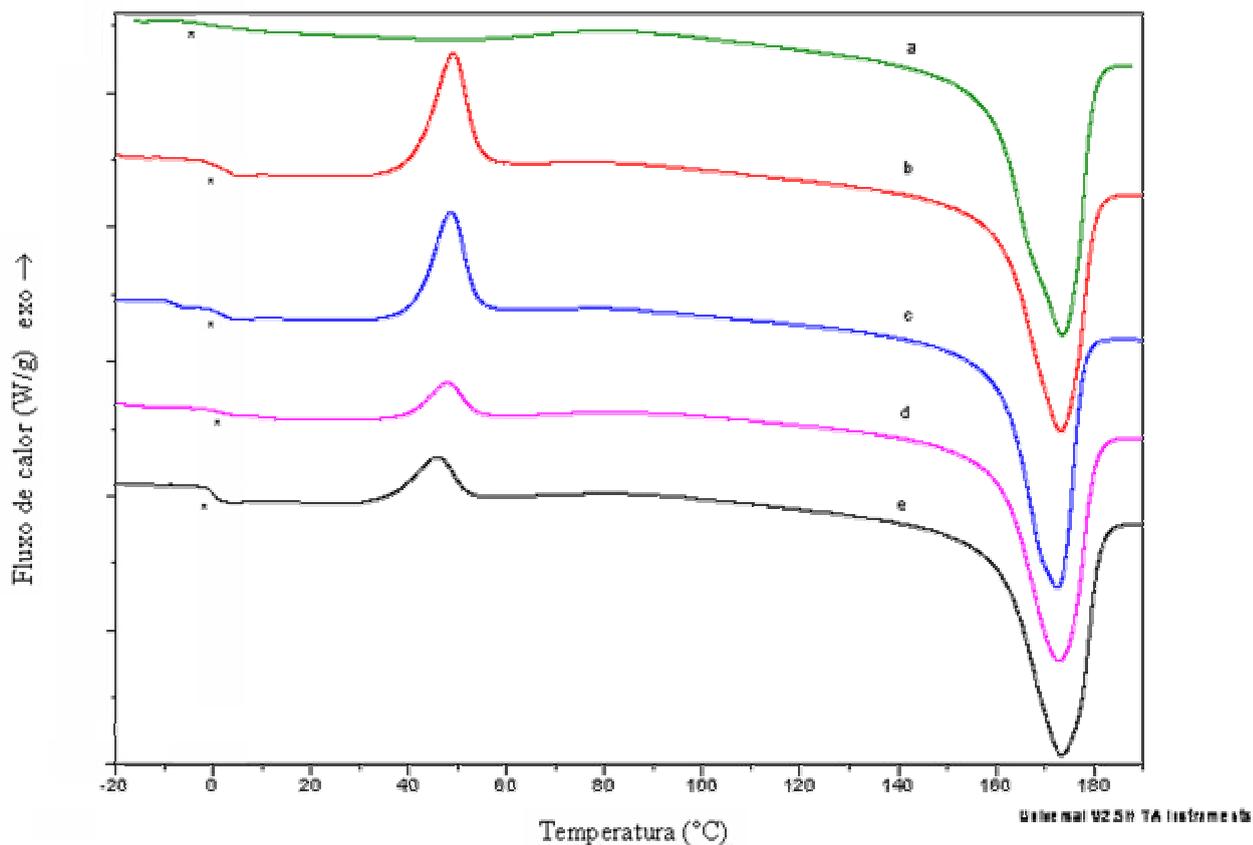
## 5.1.2 Análise da biodegradação em função do tempo de degradação para uma mesma concentração de ácido graxo

### 5.1.2.1 Calorimetria diferencial exploratória

A figura 5.2 apresenta as curvas de DSC para os filmes sintetizados sem adição de ácido oléico após 0, 7, 14 e 21 dias de degradação em solo e a amostra “21 controle ambiental”.

Pela tabela 5.1, cujos dados foram obtidos a partir das curvas de DSC, observou-se que a temperatura de transição vítrea variou de  $-4^{\circ}\text{C}$  até  $2^{\circ}\text{C}$ . É interessante notar, no entanto, que a visualização da  $T_g$  está bem caracterizada nas curvas de DSC (exceto para a amostra 0 dia), o que evidencia um polímero mais amorfo após 7 e 14 dias de degradação, fato confirmado pela diminuição do grau de cristalinidade, passando de 70,4% para 42% após 7 e 14 dias de degradação. Embora não haja alteração na temperatura de fusão no período avaliado, após 7 dias de degradação o grau de cristalinidade diminuiu cerca de 60%.

À medida que a parte amorfa vai sendo atacada pelas despolimerases microbianas, permanece uma maior fração de cristais, o que é confirmado pelo ligeiro aumento no grau de cristalinidade (51%) em 21 dias de degradação. O aumento no grau de cristalização em função do tempo de degradação também foi observado por Leenslag *et al.* (1987, *apud* Pezzin, 2001), que acreditam que esse parâmetro aumenta, pois a parte amorfa se degrada primeiro, permanecendo um maior percentual da fase cristalina. Outra possibilidade, segundo Duek *et al.* (1999, *apud* Pezzin, 2001), é que o aumento da cristalinidade seja devido a um rearranjo das cadeias menores, geradas pelo próprio processo de degradação com a formação de novos cristais.



**Figura 5.2** Curvas de DSC das amostras de P(3HB) sem adição de ácido oléico (controle) em função do tempo de degradação em solo mostrando a  $T_g$  (\*): a) 0 dia; b) 7 dias; c) 14 dias; d) 21 dias; e) 21 dias no ambiente

**Tabela 5.1** Valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ), entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), obtidos por DSC (1° e 2° aquecimento) das amostras de P(3HB) sem adição de ácido oléico (controle) em função do tempo de degradação

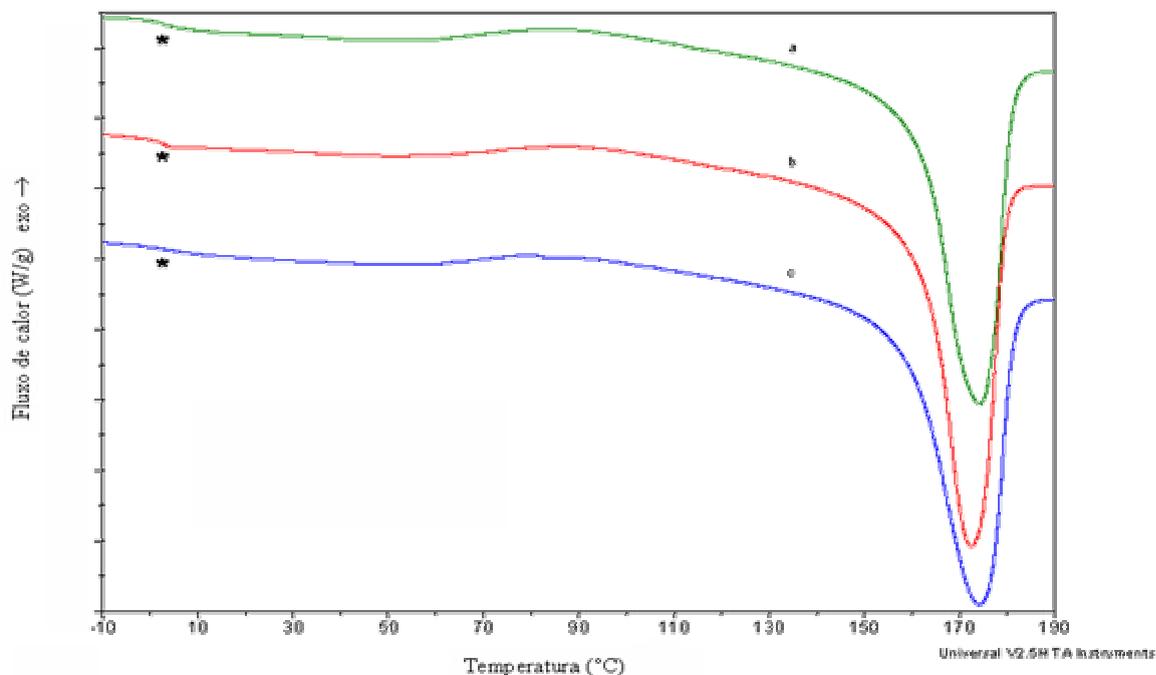
Tempo de degradação (dias)	$T_g$ (°C)		$T_c$ (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)	$T_m$ (°C)		$\Delta H_m$ (J/g)		$\% \alpha_c$
	2°aquec	2°aq			1°aquec	2°aquec	1°aquec	2°aque	
0	-4	----	----	----	174	174	92	100	70
7	2	49	22	22	174	173	72	81	42
14	2	49	18	18	175	172	69	78	42
21	1	48	6	6	175	173	67	78	51
21 controle ambiental	0	46	9	9	174	173	74	85	53

Nota-se pela tabela 5.1 que, para as amostras controles, ou seja, sem adição de ácido oléico, praticamente não houve variação na  $T_m$  e na  $T_g$ , como pode ser observado nas figuras encontradas no anexo 5 – figuras A5.2 (a) e (b).

Comparando a amostra não enterrada em solo e a amostra enterrada, verificou-se que, embora a primeira não estivesse diretamente exposta à ação microbiana, houve alteração no seu grau de cristalinidade, o qual passou de 70% para 53%. Esses resultados não estão de acordo com os autores Marchessault e Yu (2002), que demonstraram que, a temperatura ambiente, os copolímeros de 3HB-*co*-20% HV continuaram a cristalizar após várias semanas quando preparados por evaporação lenta de solvente.

A figura 5.3 apresenta as curvas de DSC para os filmes sintetizados com 0,3g/L de ácido oléico após 0, 7 e 14 dias de degradação em solo, respectivamente.

A tabela 5.2 relaciona os dados obtidos a partir das curvas de DSC. Embora tenha ocorrido uma degradação visual perceptível, foi detectada por DSC apenas uma diminuição do grau de cristalinidade de cerca de 5%, enquanto não houve mudança em nenhum dos outros parâmetros analisados (tabela 5.2).



**Figura 5.3.** Curvas de DSC das amostras de P(3HB) com 0,3g/L de ácido oléico em função do tempo de degradação mostrando a  $T_g$  (\*): a) 0 dia; b) 7 dias; c) 14 dias

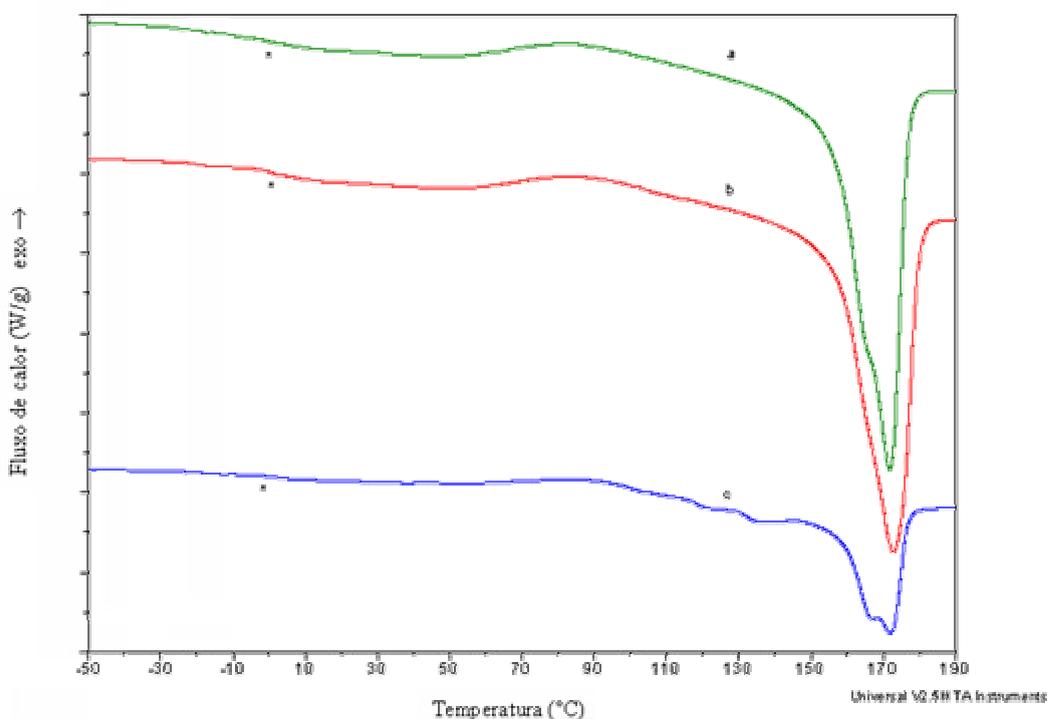
**Tabela 5.2.** Valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ), entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), obtidos por DSC (1° e 2° aquecimento) das amostras de P(3HB) contendo 0,3 g/L de ácido oléico em função do tempo de degradação

Tempo de degradação (dias)	$T_g$ (°C)	$T_c$ (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)	$T_m$ (°C)		$\Delta H_m$ (J/g)		$\%c$ (%)
	2ºaquec	2ºaquec	2ºaquec	1ºaquec	2ºaquec	1ºaquec	2ºaquec	2ºaquec
0	2	----	----	177	174	89	94	66
7	3			176	172	87	94	66
14	3			176	174	87	89	63

A figura 5.4 apresenta as curvas de DSC para os filmes sintetizados com 0,9g/L de ácido oléico após 0, 7 e 14 dias de degradação em solo.

Os dados da tabela 5.3, determinados a partir das curvas de DSC, mostraram que após 14 dias a amostra já se encontrava em estágio avançado de degradação, o que foi evidenciado pela diminuição da entalpia de fusão e conseqüentemente para o grau de cristalinidade, que passou de 62% para 27%. A temperatura de fusão dos cristalitos teve início em 120°C e se estendeu até 172°C, o que pela figura 5.4, curva c, é evidenciado pelo aparecimento de um ombro, em decorrência dos diferentes arranjos

cristalinos. Comparando os resultados obtidos por esta técnica para os filmes sintetizados com 0,3 e 0,9g/L de AO, concluímos que a degradação é mais acentuada no segundo caso, embora na análise visual a degradação aparente, nas duas concentrações de ácido oléico, tenha sido semelhante.

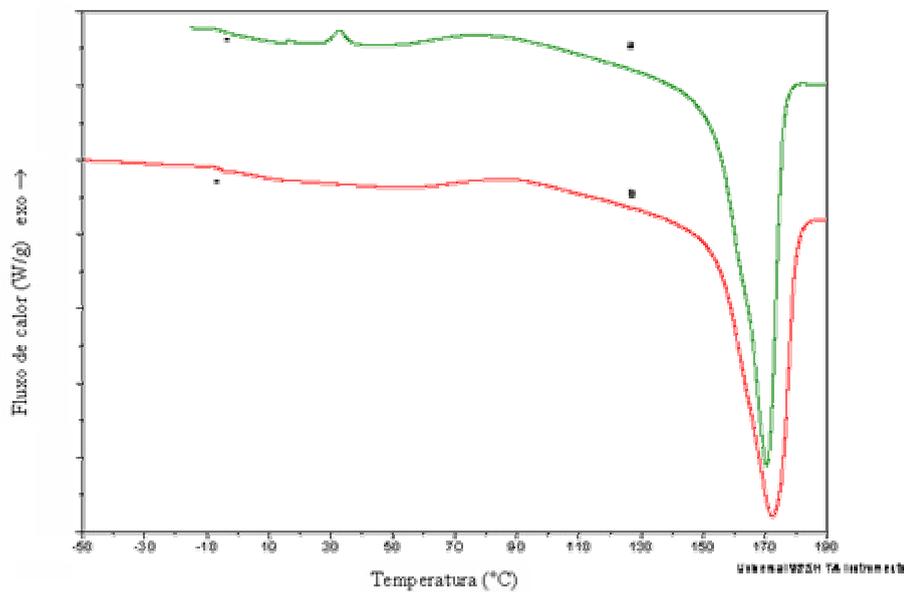


**Figura 5.4.** Curvas de DSC das amostras de P(3HB) com 0,9g/L de ácido oléico em função do tempo de degradação, mostrando a  $T_g$  (\*): a) 0 dia; b) 7 dias; c) 14 dias

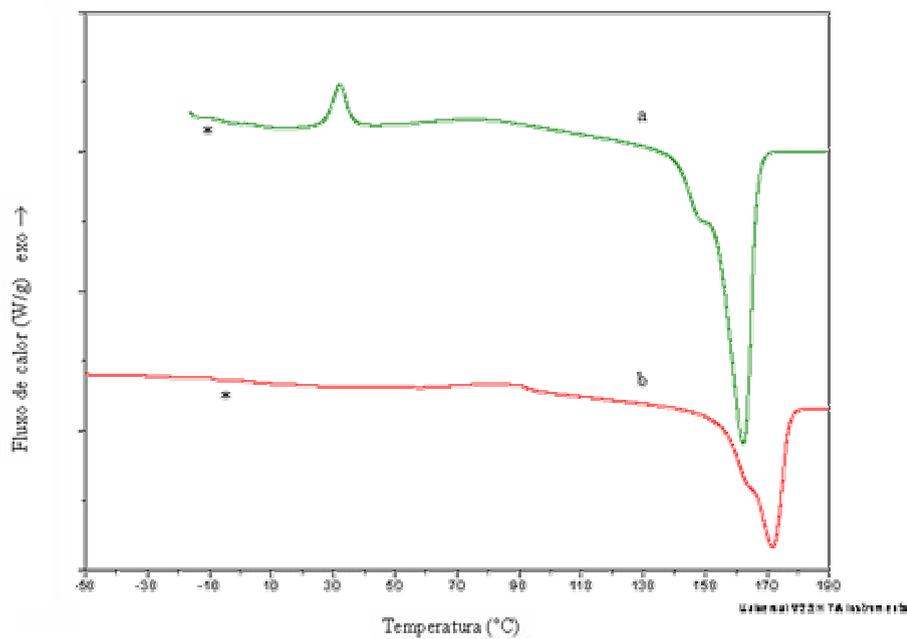
**Tabela 5.3.** Valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ), entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), obtidos por DSC (1° e 2° aquecimento) das amostras de P(3HB) contendo 0,9g/L de ácido oléico em função do tempo de degradação

Tempo de degradação (dias)	$T_g$ (°C)	$T_c$ (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)	$T_m$ (°C)		$\Delta H_m$ (J/g)		$\%c$ (%)
	2ºaquec	2ºaquec	2ºaquec	1ºaquec	2ºaquec	1ºaquec	2ºaquec	2ºaquec
0	0	----	----	173	172	83	88	62
7	1	----	----	173	173	84	86	61
14	-1	----	----	29 158 172	121 135 166 172	86 4 15	38	27

As figuras 5.5 e 5.6 apresentam as curvas de DSC para os filmes sintetizados com 1,5g/L e 3,0g/L de ácido oléico, respectivamente após 0 e 7 dias de degradação em solo.



**Figura 5.5.** Curvas de DSC das amostras de P(3HB) com 1,5g/L de ácido oléico em função do tempo de degradação, mostrando a T<sub>g</sub> (\*): a) 0 dia e b) 7 dias



**Figura 5.6.** Curvas de DSC das amostras de P(3HB) com 3g/L de ácido oléico em função do tempo de degradação mostrando a T<sub>g</sub> (\*): a) 0 dia e b) 7 dias

As tabelas 5.4 e 5.5 mostram os valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ), entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), obtidos por DSC (segundo aquecimento) das amostras de P(3HB) contendo 1,5 e 3,0g/L de ácido oléico em função do tempo de degradação, respectivamente.

Embora a análise visual tenha mostrado um grau de degradação pronunciado da amostra contendo 1,5g/L de AO após 7 dias, praticamente não houve variação na entalpia de fusão e no grau de cristalização (tabela 5.4). No entanto, para a amostra contendo 3,0g/L de AO a degradação em 7 dias foi ainda mais acentuada, sendo representada pela diminuição da entalpia de fusão, que passou de 80 para 40J/g. Da mesma forma, o material se tornou cerca de 66% menos cristalino (tabela 5.5).

**Tabela 5.4.** Valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ), entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), obtidos por DSC (1° e 2° aquecimento) das amostras de P(3HB) contendo 1,5g/L de ácido oléico em função do tempo de degradação

Tempo de degradação (dias)	$T_g$ (°C)	$T_c$ (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)	$T_m$ (°C)		$\Delta H_m$ (J/g)		$\%c$ (%)
	2°aquec	2°aquec	2°aquec	1°aquec	2°aquec	1°aquec	2°aquec	2°aquec
0	-5	33	2	173	171	92	91	63
7	-5	-----	-----	173	172	85	87	62

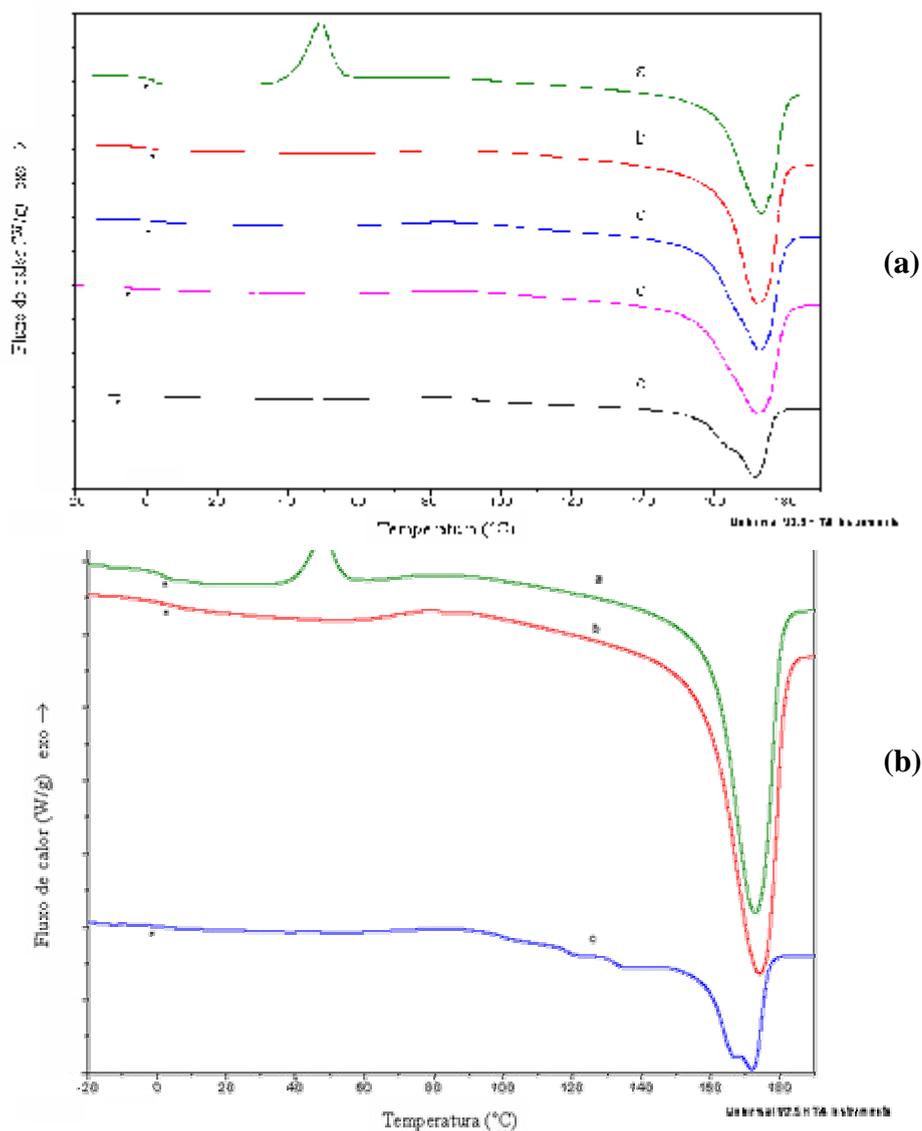
**Tabela 5.5.** Valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ), entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), obtidos por DSC (1° e 2° aquecimento) das amostras de P(3HB) contendo 3,0 g/L de ácido oléico em função do tempo de degradação mostrando a  $T_g$  (\*)

Tempo de degradação (dias)	$T_g$ (°C)	$T_c$ (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)	$T_m$ (°C)		$\Delta H_m$ (J/g)		$\%c$ (%)
	2°aquec	2°aquec	2°aquec	1°aquec	2°aquec	1°aquec	2°aquec	2°aquec
0	-10	32	5	168	149 162	78	80	52
7	-8	-----	-----	172	163 172	36	40	28

### 5.1.3 Análise da biodegradação em função da concentração de ácido oléico para um mesmo tempo de degradação

#### 5.1.3.1 Calorimetria diferencial exploratória

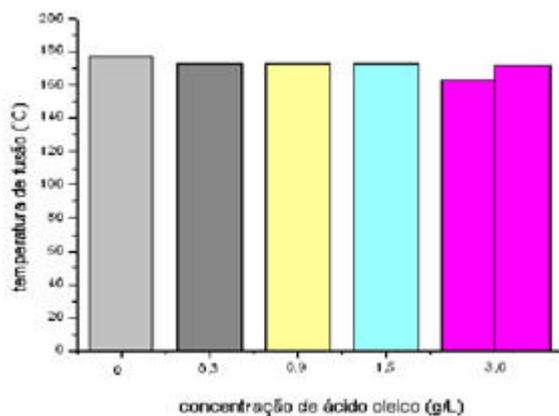
As figuras 5.7 (a) e (b) apresentam as curvas de DSC para os filmes após 7 e 14 dias de degradação



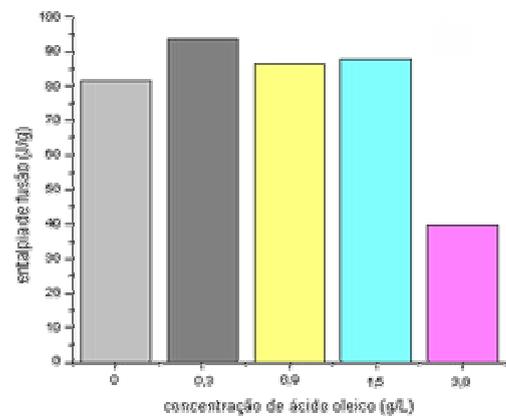
**Figura 5.7.** Comparação entre as curvas de DSC das amostras degradadas por 7 dias (a) e por 14 dias (b) em função da concentração de ácido oléico: a) 0g/L ; b) 0,3g/L; c)0,9g/L; d)1,5g/L; e)3,0g/L

A partir dos dados para entalpia e temperatura de fusão encontradas nas tabelas 5. A.1 e 5. A.2 (anexo 5) obteve-se as figuras 5.8 a e b, que correspondem à evolução da  $T_m$  e  $\Delta H_m$  em função da concentração de ácido oléico no cultivo de *Ralstonia eutropha*.

Notou-se claramente que, para um mesmo tempo de degradação (7 dias) embora praticamente não tenha havido uma variação na temperatura de fusão (figura 5.8.a), a amostra contendo 3,0g/L de AO iniciou o processo de degradação mais rapidamente (evidenciado pelo surgimento de um ombro, em temperatura de fusão mais baixa observado na curva c da figura 5.7), considerando o baixo valor de entalpia de fusão em 7 dias (figura 5.8.b). Esses resultados vêm ao encontro dos obtidos pela análise visual.



(a)

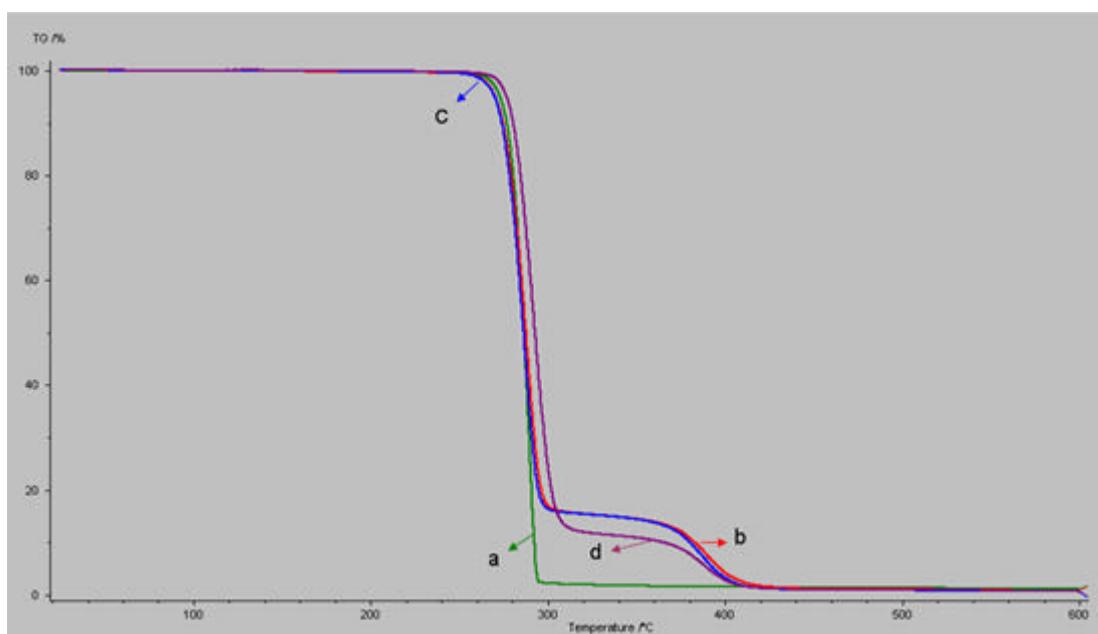


(b)

**Figura 5.8.** Evolução da temperatura de fusão de fusão ( $T_m$ ) e entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ) dos filmes de P(3HB) em função da concentração de ácido oléico no cultivo de *Ralstonia eutropha* para 7 dias de degradação em solo

### 5.1.3.2 Análise termogravimétrica

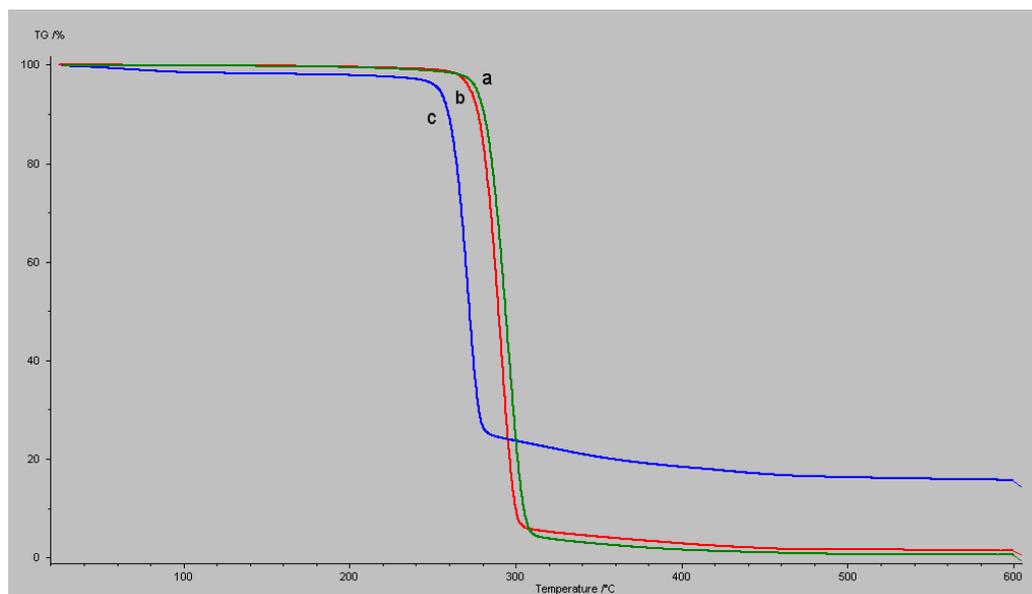
As figuras 5.9 a 5.11 apresentam os termogramas de TGA para os filmes controle (0g/L) e 0,9g/L de ácido oléico em função do tempo de biodegradação em solo até 21 dias. As tabelas 5.6 e 5.7 apresentam os dados de temperatura de início de degradação ( $T_i$ ) e temperatura máxima de degradação ( $T_{pico}$ ) e os percentuais de perda de massa obtidos por TGA da amostra de P(3HB) sem adição de ácido oléico (controle) e com 0,9g/L em função do tempo de biodegradação em solo, respectivamente.



**Figura 5.9.** Curvas termogravimétricas do P(3HB) sintetizado por *Ralstonia eutropha* sem adição de ácido oléico (controle) em função do tempo de biodegradação em solo. a) 0 dia; b) 7 dias, c) 14 dias, d) 21 dias

**Tabela 5.6.** Dados de temperatura de início de degradação ( $T_i$ ) e temperatura máxima de degradação ( $T_{pico}$ ) e os percentuais de perda de massa obtidos por TGA da amostra de P(3HB) sem adição de ácido oléico (controle) em função do tempo de biodegradação em solo

Tempo (dias)	$T_i$ 1(°C)	$T_i$ 2(°C)	$T_{pico}$ 1(°C)	$T_{pico}$ 2(°C)	Perda de massa 1 (%)	Perda de massa 2 (%)
0	280	-----	290	-----	98	-----
7	276	289	373	392	83	12
14	275	371	287	390	84	13
21	281	372	294	390	87	9



**Figura 5.10.** Curvas termogravimétricas do P(3HB) sintetizado por *Ralstonia eutropha* com adição de 0,9g/L de ácido oléico em função do tempo de biodegradação em solo. a) 0 dia; b) 7 dias, c) 14 dias

**Tabela 5.7.** Dados de temperatura de início de degradação ( $T_i$ ) e temperatura máxima de degradação ( $T_{pico}$ ) e os percentuais de perda de massa obtidos por TGA da amostra de P(3HB) com adição de 0,9g/L de ácido oléico em função do tempo de biodegradação em solo

Tempo (dias)	$T_i$ (°C)	$T_{pico}$ (°C)	Perda de massa (%)
0	283	296	98
7	280	291	97
14	262	273	78

Analisando a figura 5.9 observou-se que o polímero controle sem biodegradação (0 dia) teve apenas um estágio de degradação com  $T_i = 280^\circ\text{C}$  e 98% de perda de massa. No entanto, após 7 dias de degradação a degradação ocorreu em dois estágios, com perda de massa igual a cerca de 85% e 11% para o primeiro e segundo estágio, respectivamente.

O segundo estágio apresentou um material mais estável termicamente com  $T_i$  de degradação igual a  $370^\circ\text{C}$  (14 e 21 dias) e  $T_{pico} = 390^\circ\text{C}$ . Isto indica que durante o processo de biodegradação, as cadeias sofreram uma reorganização, estabelecendo forças intermoleculares maiores, mas que foram totalmente destruídas acima de  $400^\circ\text{C}$ .

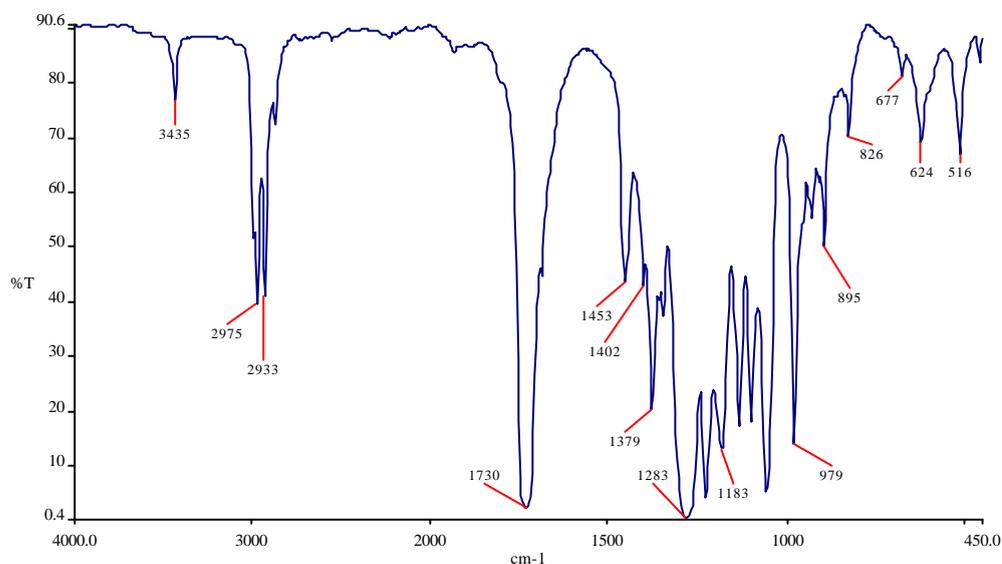
Com 0,9g/L de ácido oléico a degradação é observado em apenas 1 estágio, ocorrendo 98% de perda de massa em 7 dias. Analisando a curva em 14 dias, com o polímero em visualmente em um estágio avançado de decomposição, como apresentado na figura 5.1, a degradação ocorreu também em um único estágio com  $T_i = 262^\circ\text{C}$ , porém com perda de massa de apenas 78%. Os demais 22% de massa permaneceram sem se decompor mesmo com a temperatura se estendendo até  $600^\circ\text{C}$ . Isto pode ser explicado pois, em função do elevado grau de decomposição da amostra, não foi possível eliminar toda a terra ao redor do polímero. Supõe-se que estes material sem se decompor observado na análise seja resquícios de solo.

Ao comparar as duas amostras 0 e 0,9g/L notou-se que mesmo a amostra 0,9g/L sendo mais estável no tempo 0 dia, tem sua  $T_i$  diminuída em  $19^\circ\text{C}$  com o processo de biodegradação, o que não ocorreu para a amostra controle no mesmo período. No entanto, o filme sintetizado com 0,9g/L de ácido oléico não consegue ser totalmente degradado termicamente até  $600^\circ\text{C}$ , o que sugere a formação de uma estrutura altamente resistente à temperatura.

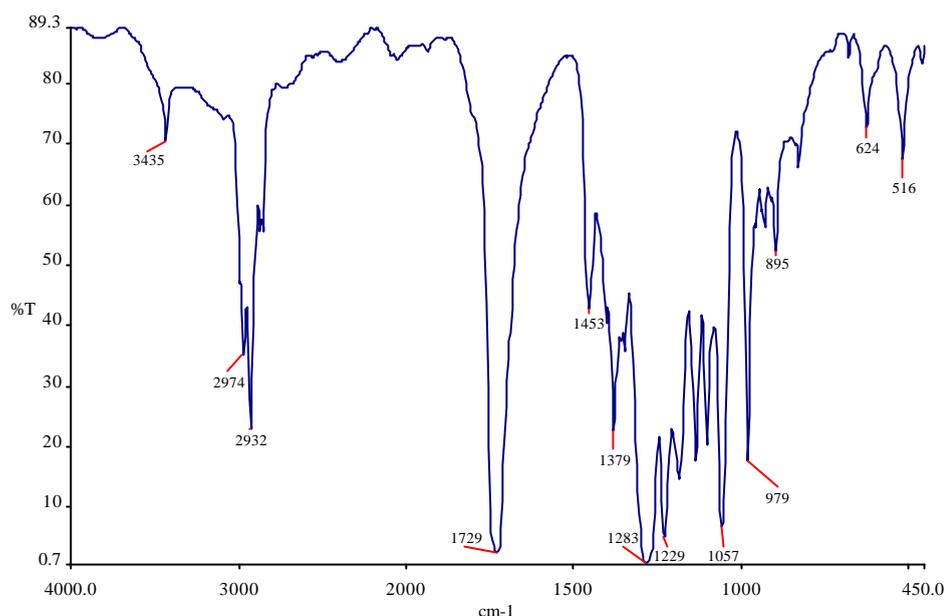
### 5.1.3.3 Espectrofotometria na região do infravermelho

Em decorrência da baixa  $T_g$  ( $-10^\circ\text{C}$ ), do baixo grau de cristalinidade e da acelerada taxa de degradação, suspeitou-se que o polímero sintetizado com 3,0g/L de AO não fosse P(3HB). Madden *et al.* (2000) comentam que *Ralstonia eutropha* é capaz de sintetizar monômeros de 4HB a partir de fontes de carbono estruturalmente correlacionadas à molécula tais como 4-ácido hidroxibutírico,  $\gamma$ -butirolactona e 1,4 butanodiol.

Dessa forma foram realizadas as análises de espectrofotometria na região do infravermelho para comparação dos espectros. Como pode ser observado pela figura 5.12 e 5.13, os picos obtidos são característicos de P(3HB), semelhante ao descrito no capítulo 4.



**Figura 5.11.** Espectro de FT-IR para o polímero sintetizado por *Ralstonia eutropha* contendo 0g/L de ácido oléico (amostra controle) no meio de cultura



**Figura 5.12** Espectro de FT-IR para o polímero sintetizado por *Ralstonia eutropha* contendo 3,0g/L de ácido oléico no meio de cultura

### Considerações finais do capítulo

Após a realização dos trabalhos deste capítulo foi possível obter algumas informações importantes com respeito à biodegradação de P(3HB) obtido a partir de *Ralstonia eutropha*.

- ❖ A taxa de degradação pela análise visual foi 3,0g/L de AO > 1,5g/L de AO > 0,9g/L de AO ~ 0,3g/L de AO > 0g/L de AO.
- ❖ As análises termogravimétricas confirmaram que nas concentrações 0,9 e 3,0g/L de AO após 7 dias de degradação em solo houve uma diminuição acentuada na entalpia de fusão e no grau de cristalinidade.
- ❖ Foram verificados 2 estágios de perda de massa para a amostra controle com o aumento do tempo de biodegradação. Para a amostra contendo 0,9g/L, a perda de massa ocorreu em um único estágio, porém 22% da amostra permaneceram sem se decompor.
- ❖ Embora se suspeitasse que o polímero obtido com adição de 3,0g/L de AO não fosse P(3HB), as análises de FT – IR sugerem tratar-se do mesmo polímero.

*Somos o que fazemos, sobretudo o que  
fazemos para mudarmos o que somos.*

(Eduardo Galeano)

## **Capítulo 6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

### **CARACTERIZAÇÃO E BIODEGRADAÇÃO DAS BLENDA DE P(3HB)/PCL**

Devido à fragilidade mecânica do P(3HB), suas aplicações são limitadas. A fim de se obter um material com melhores características, o P(3HB) pode ser modificado através de misturas físicas com outros polímeros que sejam também biodegradáveis. A poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) pode agir como plastificante polimérico melhorando a flexibilidade da blenda, visando o emprego desses filmes em diversas áreas do meio ambiente. Dessa forma, este trabalho foi finalizado propondo o estudo de blendas de P(3HB) e PCL, ambos materiais individualmente biodegradáveis, para balancear as propriedades desses polímeros.

## 6.1 Miscibilidade das blendas

Os resultados apresentados a seguir referem-se à investigação da miscibilidade de blendas de P(3HB) e PCL nas composições de (0/100), (20/80), (50/50), (80/20) e (100/0)% (m/m). Os resultados foram apresentados em função das técnicas de caracterização (DSC, TGA e SEM).

### 6.1.1 Calorimetria diferencial exploratória

O DSC é uma ferramenta muito útil no estudo de blendas poliméricas, pois mediante a investigação das temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ) e de fusão ( $T_m$ ) é possível investigar a miscibilidade de blendas (EGUIBURU *et al.* 1998).

A figura 6.1 apresenta as curvas de DSC para blendas de P(3HB)/PCL. Os dados de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) e temperatura de fusão ( $T_m$ ), determinados a partir dos termogramas de DSC para o segundo aquecimento para todas as blendas estão apresentados na tabela 6.1 (foi considerado o termograma do segundo aquecimento, pois este permite apagar a história térmica da amostra, possibilitando sua comparação).

Os valores de  $T_g$  situaram-se em  $-67^\circ\text{C}$  e  $-1^\circ\text{C}$  para a PCL e o P(3HB), respectivamente (tabela 6.1). Dois valores de  $T_g$ s distintos foram verificadas para todas as composições de blendas. Observou-se que, para as blendas, a  $T_g$  da PCL permaneceu praticamente constante. Entretanto, ocorreu uma pequena diminuição da  $T_g$  do P(3HB) com o aumento do conteúdo de PCL (cerca de  $4^\circ\text{C}$ ), sugerindo miscibilidade parcial entre os polímeros na parte amorfa (VOGELSANGER *et al.*, 2003). Gassner e Owen (1994) também avaliaram as propriedades das blendas de P(3HB)/PCL nas composições (0/100), (20/80),

(40/60), (60/40), (80/20) e (100/0)% (m/m), porém não foi possível distinguir as temperaturas de transição vítrea presumivelmente em decorrência da alta cristalinidade.

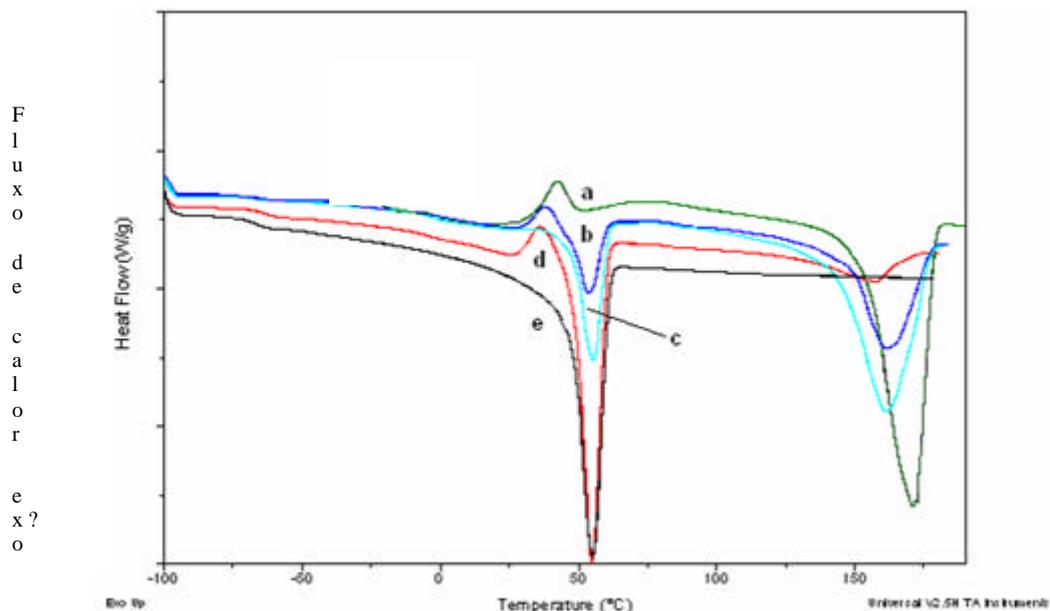
Koyama e Doi (1996) observaram apenas um valor de  $T_g$  nos termogramas de DSC indicando miscibilidade de blendas de P(3HB) e PLLA, quando a massa molar do PLLA variou entre 9.900–18.000. Para valores de  $M_w$  maiores que 20.000, os termogramas exibiram dois valores para  $T_g$ , sugerindo uma separação bifásica.

Também foram observados na figura 6.1 dois picos endotérmicos em 55°C e 171°C relacionados respectivamente com a  $T_m$  do PCL e do P(3HB). Praticamente não se observou variação da  $T_m$  do PCL nas blendas. Por outro lado, ocorreu uma diminuição gradual da  $T_m$  do P(3HB) nas blendas em função do aumento do teor de PCL (cerca de 10°C com adição de 20 a 50% e 13°C com a adição de 80% de PCL). Isso indica que pequenas quantidades de um componente foram solubilizadas no outro componente. O abaixamento da  $T_m$  também pode ser utilizado para investigar a miscibilidade de misturas poliméricas, indicando que pode estar havendo miscibilidade parcial entre os polímeros também na parte cristalina. Essas conclusões sobre a miscibilidade parcial do sistema devem-se ao fato de que a  $T_g$  de um polímero está relacionada com a parte amorfa, enquanto a  $T_m$  está relacionada com a parte cristalina do mesmo polímero (CHIELLINI e SOLLARO, 1999).

Kumagai e Doi (1992b), investigaram a miscibilidade, morfologia e biodegradabilidade de blendas de P(3HB)/PCL e concluíram que esses polímeros são imiscíveis no estado amorfo e na parte cristalina.

Por outro lado, Gassner e Owen (1994) verificaram, em uma primeira análise, que a posição dos picos endotérmicos não havia sido afetada pela composição da blenda. A  $T_m$  situou-se em 63°C e 180°C para os cristais de PCL e P(3HB), respectivamente, sugerindo que a

separação dos macrodomínios de PCL e P(3HB) ocorreram na etapa de fusão com cristalização independente das duas fases após subsequente resfriamento. No entanto, os autores não deixaram de relatar um deslocamento gradual de cada pico de fusão para temperaturas menores com o aumento da quantidade do outro componente, comportamento semelhante ao obtido neste trabalho. Apesar de imiscíveis em escala molecular, os autores constataram que as blendas apresentavam propriedades mecânicas compatíveis para determinadas aplicações. Nenhum efeito sinérgico foi encontrado que pudesse ser explorado para obtenção de um material com propriedades superiores aos dos componentes puros.



**Figura 6.1.** Curvas de DSC para as blendas P(3HB)/PCL obtidas do 2<sup>o</sup> aquecimento a) P(3HB), b) P(3HB)/PCL 80/20, c) P(3HB)/PCL 50/50, d) P(3HB)/PCL 20/80, e) PCL

**Tabela 6.1** Dados de  $T_g$  e  $T_m$  para as blendas P(3HB)/PCL obtidas do 2<sup>o</sup> aquecimento

Blendas	$T_g$ PCL (°C)	$T_m$ PCL (°C)	$T_g$ P(3HB) (°C)	$T_m$ P(3HB) (°C)
<b>PCL</b>	-67	55	--	--
<b>P(3HB)/PCL 20/80</b>	-64	55	-4	157
<b>P(3HB)/PCL 50/50</b>	-63	55	-3	161
<b>P(3HB)/PCL 80/20</b>	-68	54	-3	161
<b>P(3HB)</b>	--	--	-1	171

Duarte *et al.* (2006) prepararam blendas de P(3HB)/PCL 70/30 por injeção e observaram a formação de dois valores de  $T_g$ , um a  $-11^\circ\text{C}$ , correspondendo a matrix do P(3HB) e outra a  $-63^\circ\text{C}$  atribuída ao domínio PCL. O decréscimo acentuado na diminuição da  $T_g$  do P(3HB) evidencia uma miscibilidade parcial do PCL no P(3HB).

Outros pesquisadores estudaram a miscibilidade de P(3HB) com outros (co)polímeros e blendas. Vanin e colaboradores (2004), estudando a biodegradação *in vitro* das blendas de P(3HB)/PLLA verificaram, por meio dos resultados do segundo aquecimento, que as blendas são imiscíveis, apresentando dois valores de  $T_g$ . Esse comportamento não é observado quando se trata de copolímeros a exemplo do poli(3-hidroxi butirato-*co*-3-hidroxi valerato-*co*-4-hidroxi butirato).

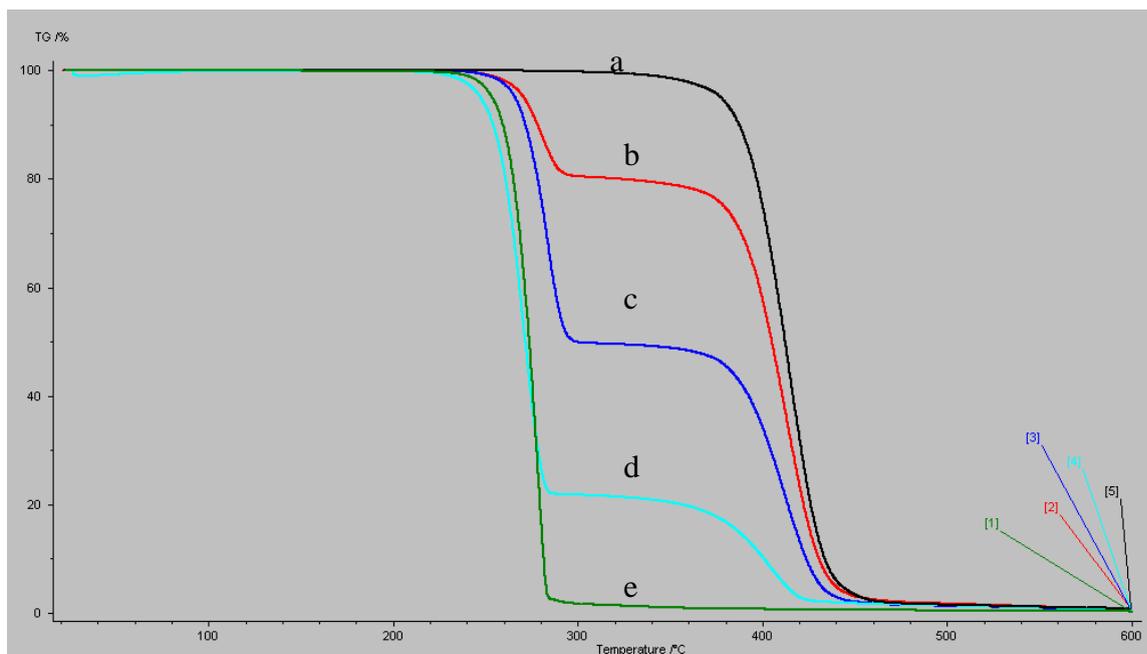
A incorporação simultânea dos monômeros de 3HV e 4HB na molécula de P(3HB) produz termopolímeros com profunda influência nas propriedades térmicas do polímero. Isso foi observado por Madden *et al.* (2000) onde a  $T_m$  dos terpolímeros com diferentes frações de 4HB e 3HV variou entre  $106\text{--}147^\circ\text{C}$ , que é notadamente menor do que o observado para o copolímero P(3HB-*co*-3HV) ou copolímero P(3HB-*co*-4HB) contendo a mesma fração de 3HB.

### 6.1.2 Análise termogravimétrica (TGA)

As blendas foram analisadas por TGA para avaliar a sua degradação térmica. Os valores de temperatura inicial de perda de massa ( $T_i$ ), temperatura máxima de degradação ( $T_{\text{pico}}$ ), porcentagem de perda de massa para o P(3HB) e para a PCL em todas as composições, obtidos pelos termogramas de TGA, são mostrados na tabela 6.2.

As curvas de TGA para os homopolímeros e para as blendas de P(3HB)/PCL são apresentadas na figura 6.2. Nos termogramas, observa-se que os homopolímeros sofrem apenas um estágio de perda de massa; a PCL possui maior estabilidade térmica que o P(3HB), enquanto as blendas sofrem dois estágios de perda de massa, sendo o primeiro estágio atribuído à perda de massa do P(3HB) e o segundo a PCL. Os estágios de perda de massa variam de acordo com a porcentagem em massa de cada componente da blenda (Vanin *et al.*, 2004).

Os valores de  $T_{\text{pico}}$  foram determinados a partir das temperaturas máximas dos picos observados na primeira derivada das curvas de TGA. O P(3HB) puro possui  $T_i = 265^\circ\text{C}$  e  $T_{\text{pico}} = 279^\circ\text{C}$ . Esses dados estão de acordo com Quental (2001) e Vanin *et al.* (2004). Os valores de  $T_i$  e  $T_{\text{pico}}$  do P(3HB) permaneceram praticamente constantes em função do aumento do conteúdo de PCL na blenda. Por outro lado, a PCL pura apresentou  $T_i = 391^\circ\text{C}$  e  $T_{\text{pico}} = 415^\circ\text{C}$ . A adição de 20 a 50% de P(3HB) na blenda não altera a  $T_i$  e  $T_{\text{pico}}$  da PCL. Entretanto, a adição de 80% de P(3HB) na blenda decresceu em  $12,9^\circ\text{C}$  a  $T_i$  da PCL, e  $10^\circ\text{C}$  a  $T_{\text{pico}}$  da PCL ( $T_i$  PCL =  $378^\circ\text{C}$  e  $T_{\text{pico}}$  PCL =  $405^\circ\text{C}$ ), indicando que a presença de alto teor de P(3HB) diminuiu a estabilidade térmica da PCL na blenda (VOGELSANGER *et al.*, 2003). Vanin e colaboradores (2004) verificaram que a temperatura de degradação da PLLA também foi diminuída com o aumento do conteúdo de P(3HB). Um trabalho recente mostrou a possibilidade de controlar o perfil da degradação hidrolítica de blendas acelerando-se a degradação de poli(L-ácido láctico) (PLLA) mediante adição de poli(*p*-dioxanona) (PPD) (PEZZIN *et al.*, 2003).



**Figura 6.2.** Curvas de TGA para os homopolímeros e as blends P(3HB)/PCL [a P(3HB) [b] P(3HB)/PCL (20/80); [c] P(3HB)/PCL (50/50); [d] P(3HB)/PCL (80/20); [e] PCL

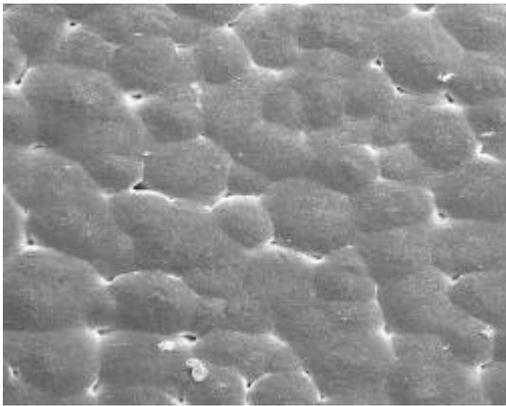
**Tabela 6.2.** Dados de TGA para os homopolímeros e as blends P(3HB)/PCL. Valores de temperatura inicial de perda de massa ( $T_{i1}$ ) e temperatura máxima de perda de massa ( $T_{pico}$ ) para o P(3HB) e PCL, % perda de massa do P(3HB) e PCL

Blendas	$T_{i1}$	$T_{i2}$	$T_{pico}$	$T_{pico}$	% perda massa P(3HB)	% perda massa PCL
	P(3HB) °C	PCL °C	P(3HB) °C	PCL °C		
PCL	----	391	----	415	----	98
P(3HB)/PCL 20/80	266	390	281	414	19	76
P(3HB)/PCL 50/50	270	389	285	414	50	46
P(3HB)/PCL 80/20	257	378	271	405	79	21
P(3HB)	265	----	279	----	100	----

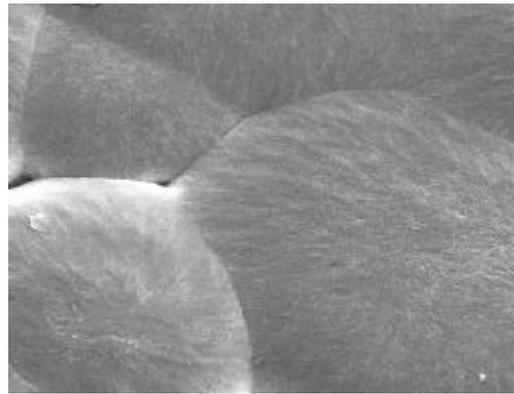
### 6.1.3 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

As micrografias de SEM da superfície dos homopolímeros revelaram que o P(3HB) apresenta uma superfície rugosa e irregular (figuras 6.3a1 e 6.3a2), enquanto a PCL possui uma superfície lisa, descontínua, com espaços entre os arranjos cristalinos,

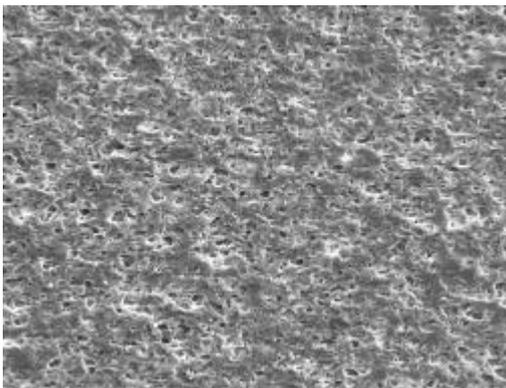
que são limitados pelos arranjos cristalinos vizinhos, formando polígonos (Figuras 6.3b1 e 6.3b2). Já em relação às blendas P(3HB)/PCL, notou-se que a composição P(3HB)/PCL 80/20 apresenta-se homogênea, similar à morfologia do P(3HB) puro, não sendo possível distinguir a presença de uma segunda fase (figuras 6.3d1 e 6.3d2). Por outro lado, a composição P(3HB)/PCL 50/50 apresentou uma morfologia heterogênea, mostrando claramente a presença de macrodomínios e separação de fases, o que caracteriza a composição como imiscível (figuras 6.3c1, 6.3c2 e 6.3c3). Por DSC, verificou-se uma variação dos valores de  $T_g$  e  $T_m$  nessa composição, sugerindo que este sistema está mais próximo da imiscibilidade parcial concordando com os resultados obtidos por SEM.



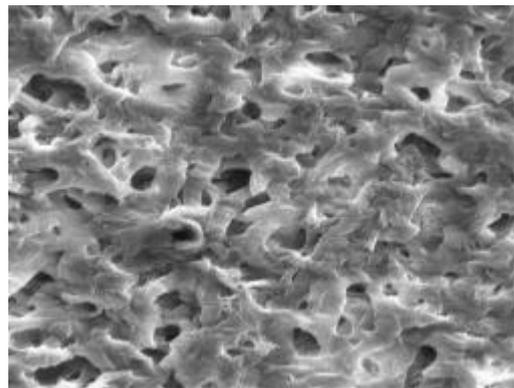
a1) P(3HB) 500x



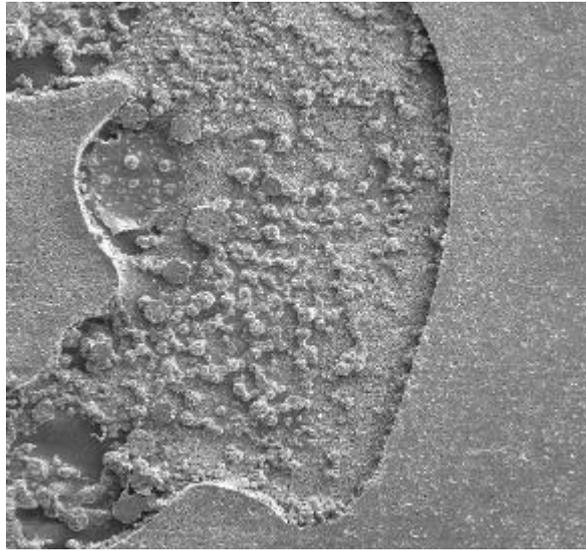
a2) P(3HB) 2000x



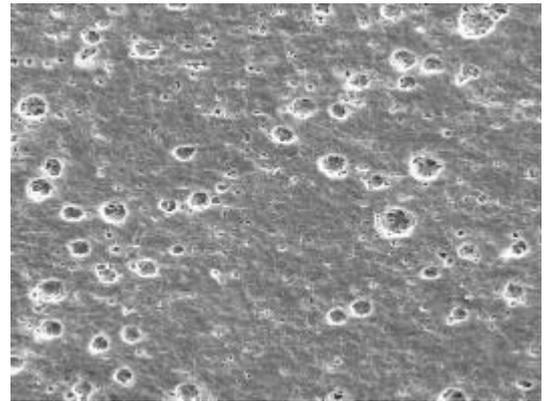
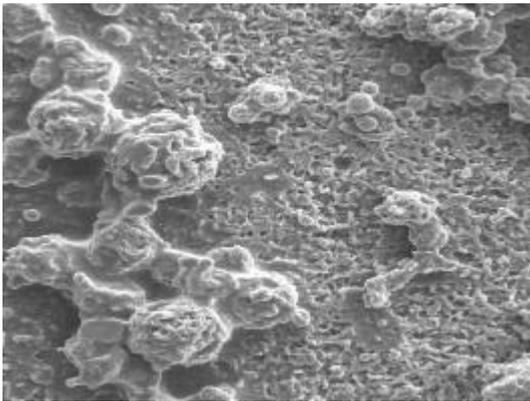
b1) PCL 100x

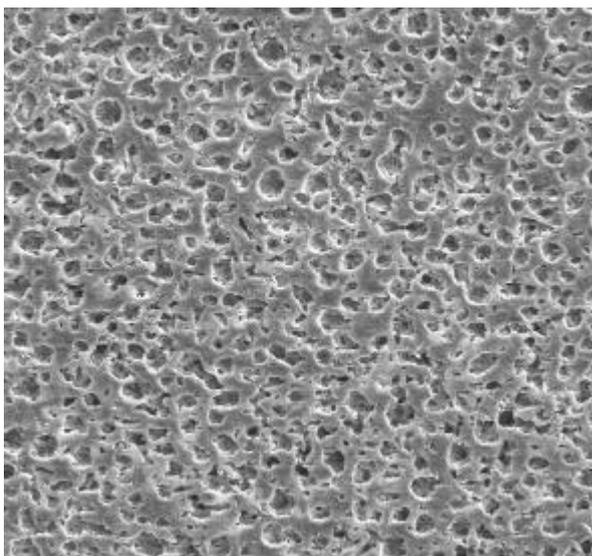


b2) PCL 500x

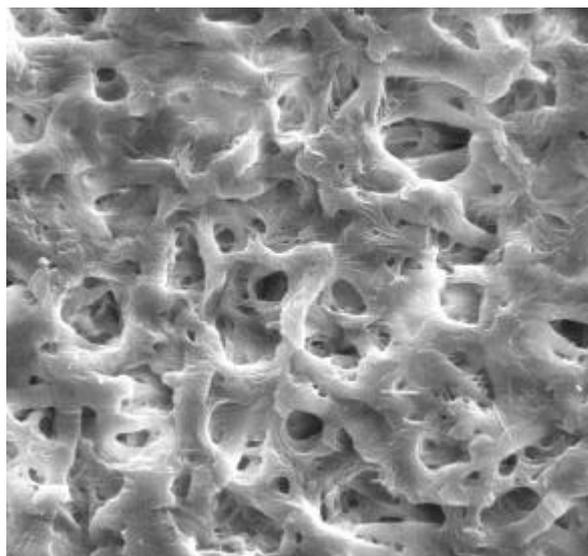


c1) P(3HB)/PCL 50/50 50x

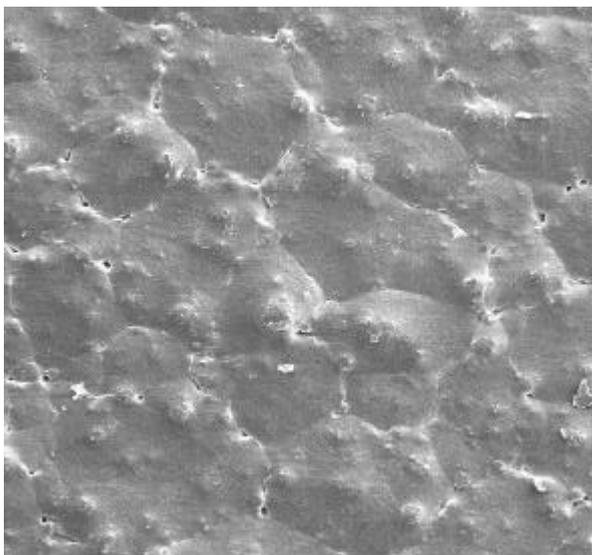




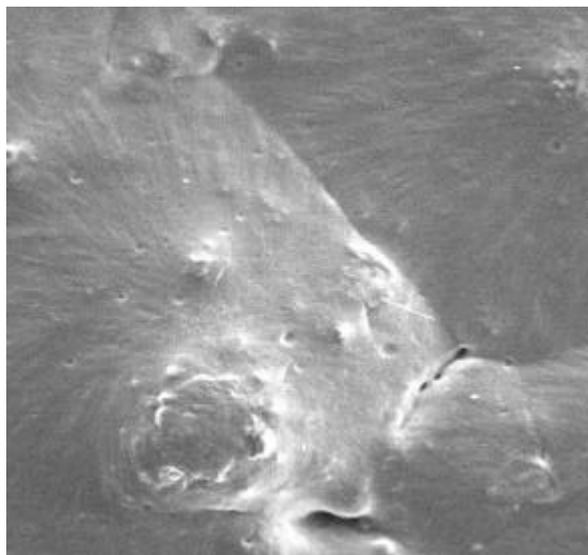
d1) P(3HB)/PCL 80/20 500x



d2) P(3HB)/PCL 80/20 2000x



e1) P(3HB)/PCL 20/80 100x



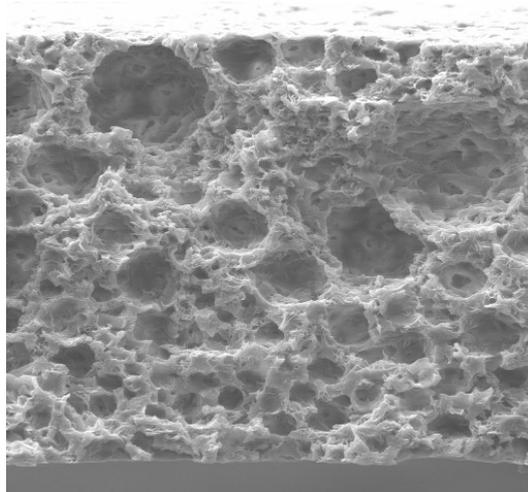
e2) P(3HB)/PCL 20/80 500x

**Figura 6.3** Micrografias de SEM (superfície) de blendas P(3HB)/PCL

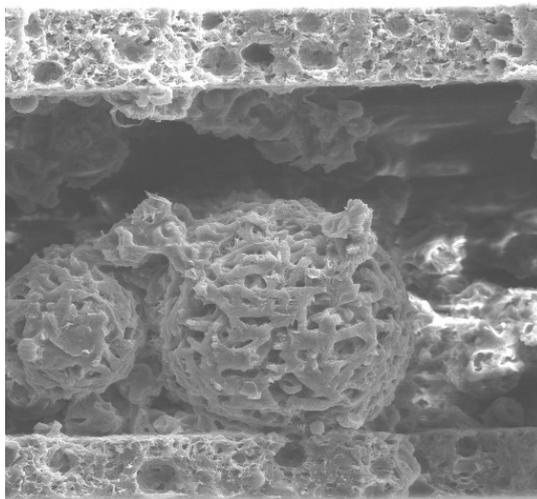
A blenda P(3HB)/PCL 20/80 também apresentou morfologia mais próxima do polímero presente em maior porcentagem, ou seja, a PCL. Entretanto, notou-se o

parecimento de aglomerados, que não são observados no PCL puro, sugerindo que estes aglomerados podem ser atribuídos ao P(3HB) presente na blenda (6.3e1 e 6.3e2).

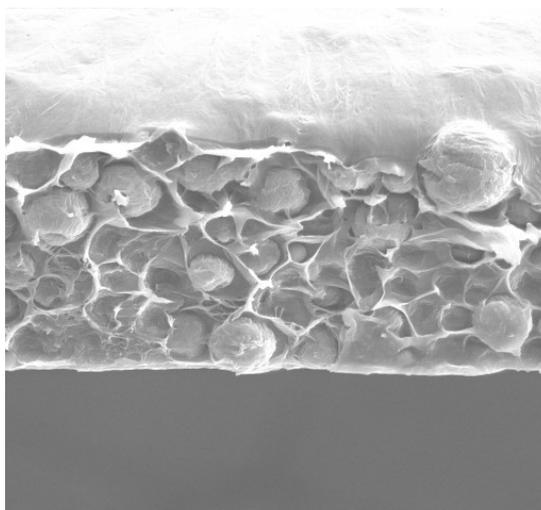
As micrografias de SEM da superfície de fratura das blendas estão de acordo com os resultados de superfície. Observou-se que a blenda P(3HB)/PCL 80/20 obtida por evaporação de solvente, apresentou fratura homogênea, não sendo possível distinguir duas fases (figura 6.4a). Já as micrografias da blenda P(3HB)/PCL 50/50 mostraram de forma visível duas fases, sugerindo que a fase interna pode ser atribuída ao P(3HB), visto que a morfologia da esfera é similar a esse polímero e a fase externa pode ser atribuída ao PCL (figura 6.4b). A superfície de fratura da blenda P(3HB)/PCL 20/80 também mostra claramente uma separação entre as fases, sendo a matriz constituída por PCL e as esferas atribuídas à fase em menor quantidade, o P(3HB) (figura 6.4c). A micrografia com maior aumento das esferas mostrou que estas possuem morfologia similar ao P(3HB).



a) P(3HB)/PCL 80/20



b) P(3HB)/PCL 50/50



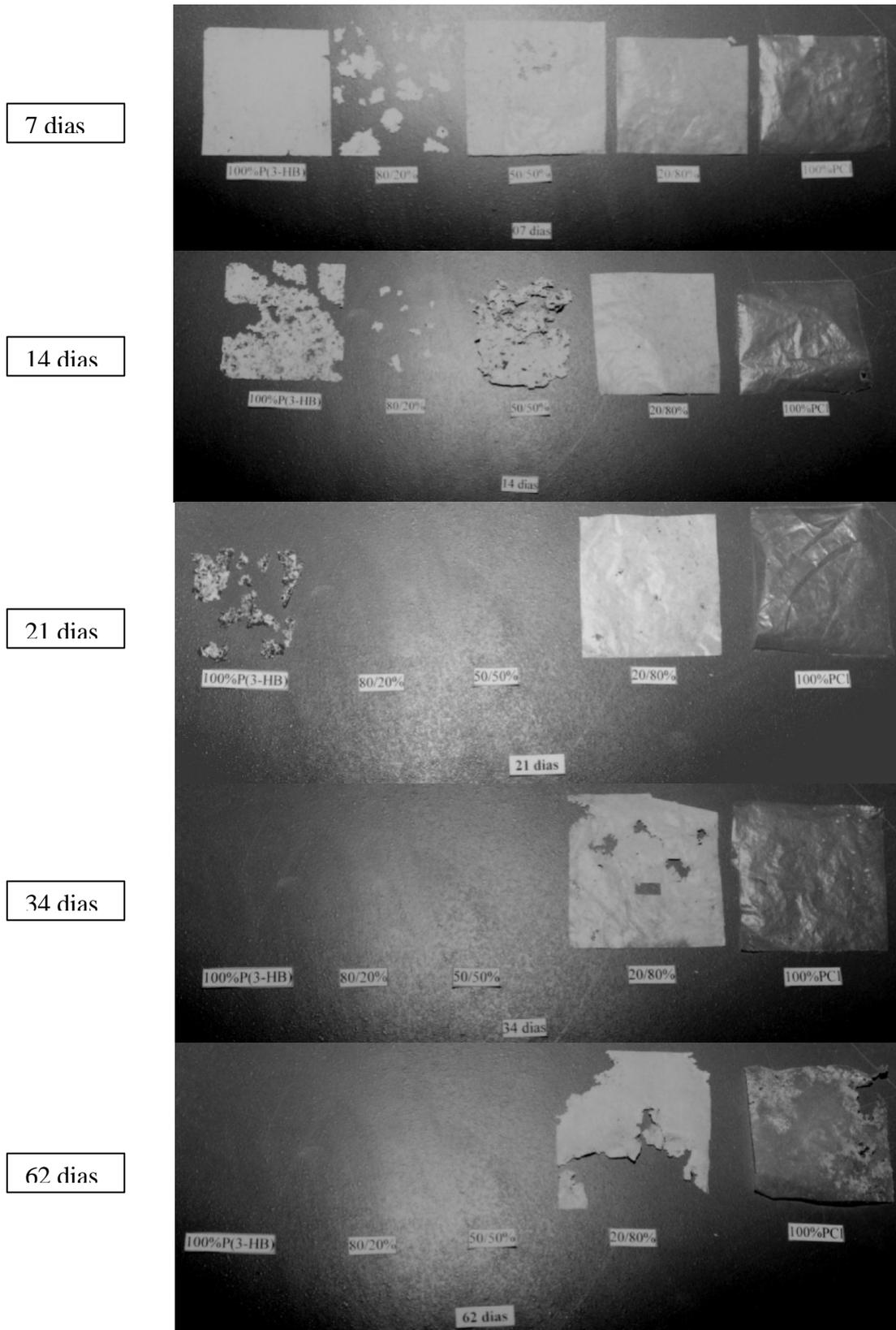
c) P(3HB)/PCL 20/80

**Figura 6.4.** Micrografías de SEM (superficie de fratura) de blendas P(3HB)/PCL

## 6.2 Biodegradação das blendas

### 6.2.1 Análise visual

As blendas P(3HB)/PCL foram fotografadas após a biodegradação em solo e as fotos estão apresentadas na figura 6.5. Após somente 7 dias de biodegradação, a blenda P(3HB)/PCL 80/20 já se encontrou severamente degradada, enquanto a composição P(3HB)/PCL 50/50 estava no início do ataque pelos microrganismos. Com 14 dias, só foi possível encontrar poucos fragmentos da composição 80/20, enquanto as composições 50/50 e 100/0 já se apresentavam bastante deterioradas. Após 21 dias, observou-se que as blendas 80/20 e 50/50 já haviam sido completamente decompostas, enquanto a composição 100/0 estava toda fragmentada, encontrando-se nos últimos estágios de degradação. Foram observados alguns orifícios na composição 20/80, indício de ataque microbiano já iniciado nessa blenda. Com 34 dias de biodegradação, o filme de P(3HB) foi completamente degradado pelos microrganismos, enquanto a composição 20/80 já se apresentava bastante fragilizada. A PCL mostrou o início do aparecimento de colônias, sugerindo que o início da degradação da PCL ocorre após 34 dias. Com 62 dias de biodegradação, observou-se ainda um grande fragmento da blenda 20/80, bem mais deteriorado do que com 34 dias, enquanto a PCL já apresenta sinais críticos de biodegradação.

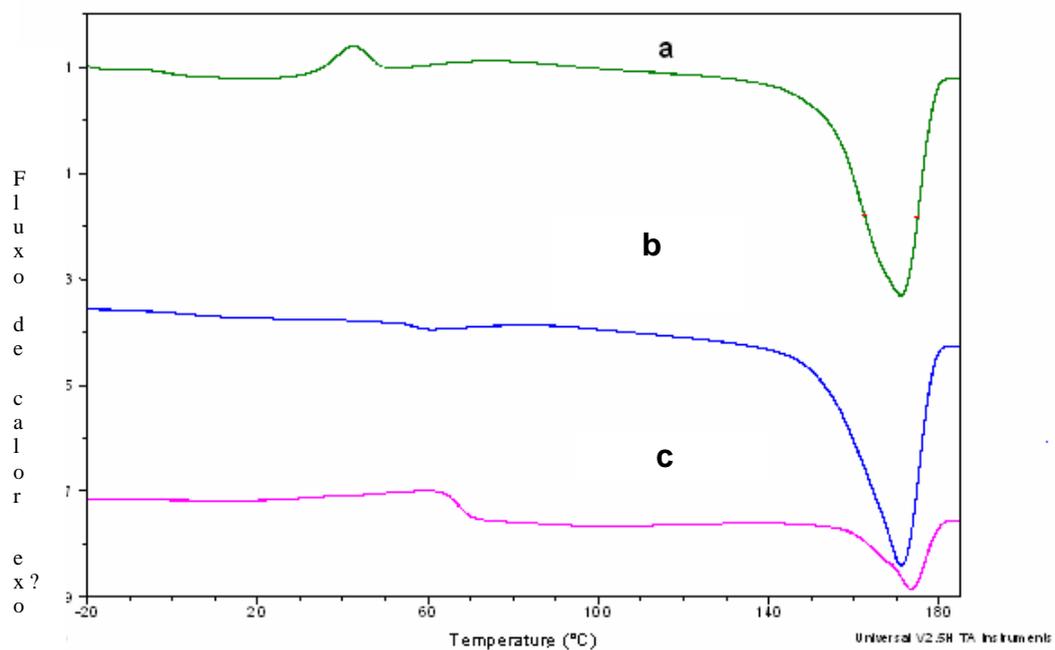


**Figura 6.5** Fotos das blendas P(3HB)/PCL biodegradadas em solo após 7, 14, 21, 34 e 62 dias

Pela análise visual foi possível concluir que a taxa de biodegradação ocorreu da seguinte forma: P(3HB)/PCL 80/20 > P(3HB)/PCL 50/50 > P(3HB) puro > P(3HB)/PCL 20/80 > PCL puro. Conclui-se que algumas blendas degradam-se mais rapidamente do que os polímeros puros, ou seja, os resultados mostram que o acréscimo de uma pequena quantidade de PCL (20 a 50%) acelera consideravelmente a biodegradação do material.

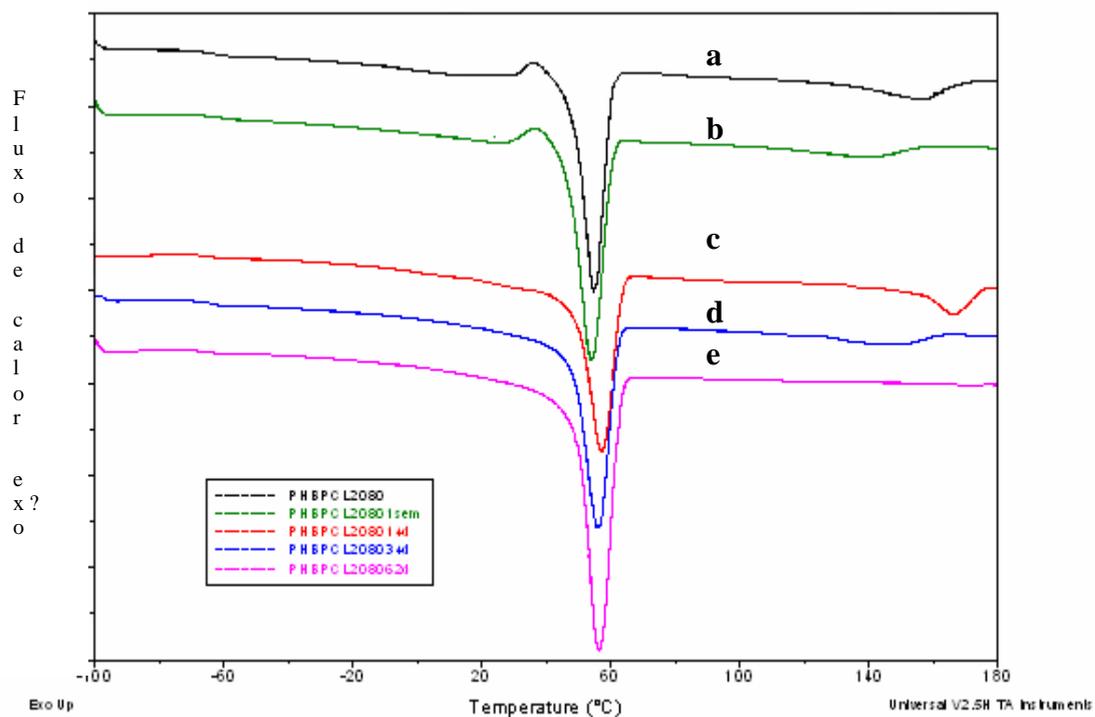
### 6.2.2 Calorimetria diferencial exploratória

A figura 6.6 mostra as curvas de DSC para o P(3HB) puro após biodegradação em solo. A amostra sem degradação apresentou um pico de cristalização no segundo aquecimento. Observou-se que após 14 e 21 dias, o pico de cristalização desapareceu e que a  $T_m$  praticamente não variou. Em 21 dias a entalpia de fusão diminuiu consideravelmente, permitindo concluir que o polímero está em estágio bem avançado de degradação.



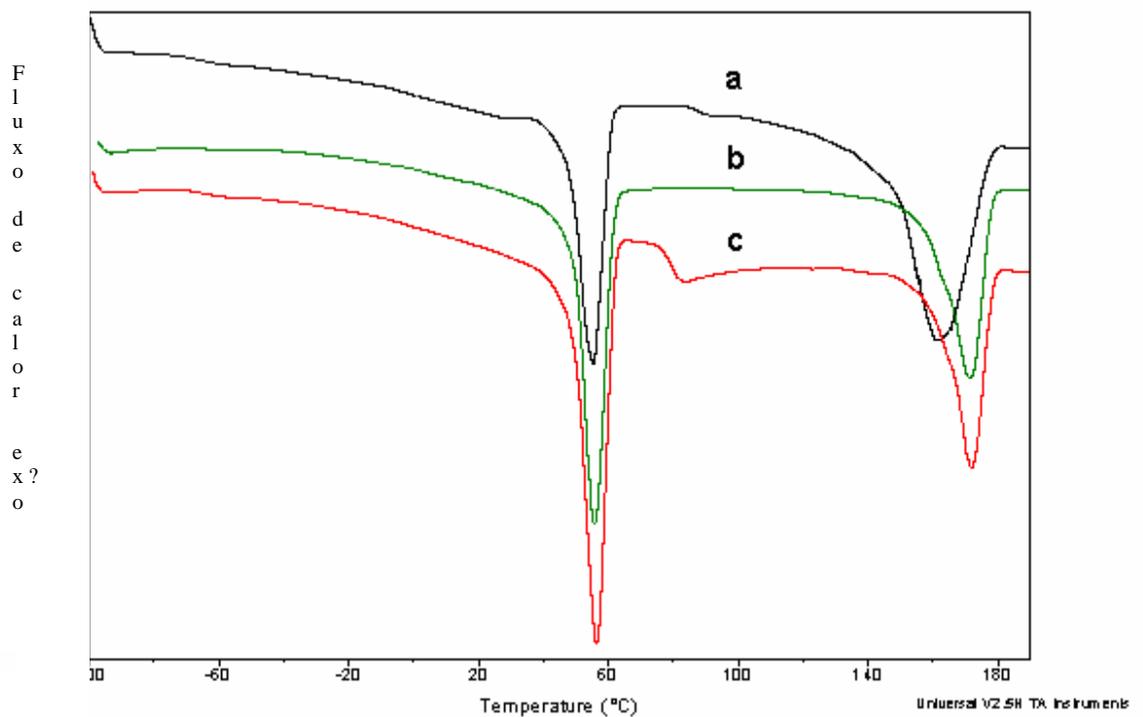
**Figura 6.6** Curvas de DSC para o homopolímero P(3HB) após biodegradação em solo. [a] t = 0 dia, [b] t = 14 dias, [c] t = 21 dias

A figura 6.7 apresenta as curvas de DSC para a blenda P(3HB)/PCL 20/80. Observou-se claramente que a  $T_m$  da PCL praticamente não se alterou em função do tempo de biodegradação. Após 62 dias, não se observou mais o pico de fusão do P(3HB) na blenda, o que indica que o polímero já se degradou completamente após esse período.



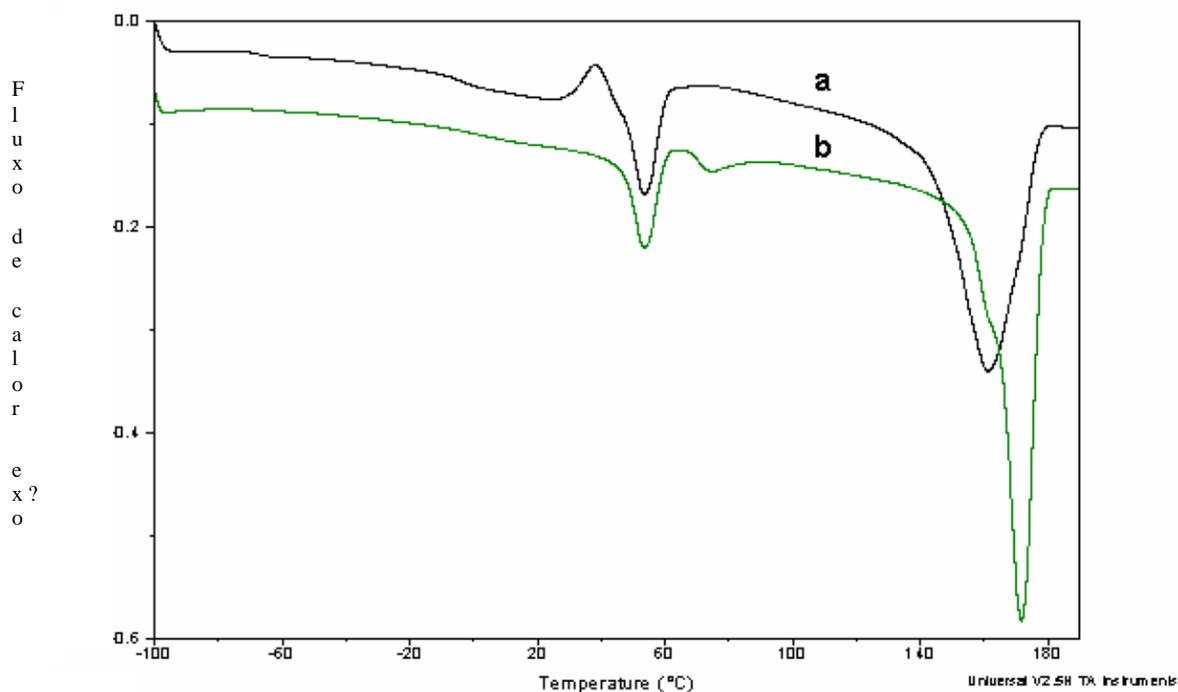
**Figura 6.7** Curvas de DSC para as blendas P(3HB)/PCL 20/80 após biodegradação em solo – [a] t = 0 dia, [b] t = 7 dias, [c] t = 14 dias, [d] t = 21 dias, [e] t = 62 dias

A figura 6.8 apresenta as curvas de DSC para a blenda P(3HB)/PCL 50/50. Observou-se um aumento significativo da entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ) da PCL em função do tempo de biodegradação. Como a entalpia de fusão está diretamente relacionada com o grau de cristalinidade do material, pode-se concluir que a cristalinidade da PCL foi aumentada com o aumento do tempo de biodegradação. Esses resultados indicam que a degradação se inicia pela parte amorfa do polímero, para depois ocorrer degradação da parte cristalina, concordando com os estudos de Kumagai e Doi (1992a). Pezzin e colaboradores (2002) avaliaram a degradação hidrolítica em blendas de PPD/PLLA e constataram que com o aumento da degradação ocorria um rearranjo das cadeias poliméricas, formando novos cristais e resultando no aumento do grau de cristalinidade.



**Figura 6.8** Curvas de DSC para as blendas P(3HB)/PCL 50/50 após biodegradação em solo [a] t = 0 dia, [b] t = 7 dias, [c] t = 14 dias

A figura 6.9 mostra as curvas de DSC para a blenda P(3HB)/PCL 80/20. Observa-se que, após uma semana de biodegradação, o pico de fusão da PCL dividiu-se em dois picos endotérmicos, ou seja, verificou-se o aparecimento de um segundo pico endotérmico (com entalpia de fusão menor) em temperatura um pouco superior ao primeiro pico. Em relação ao P(3HB), observou-se aumento da  $T_m$  após 7 dias.

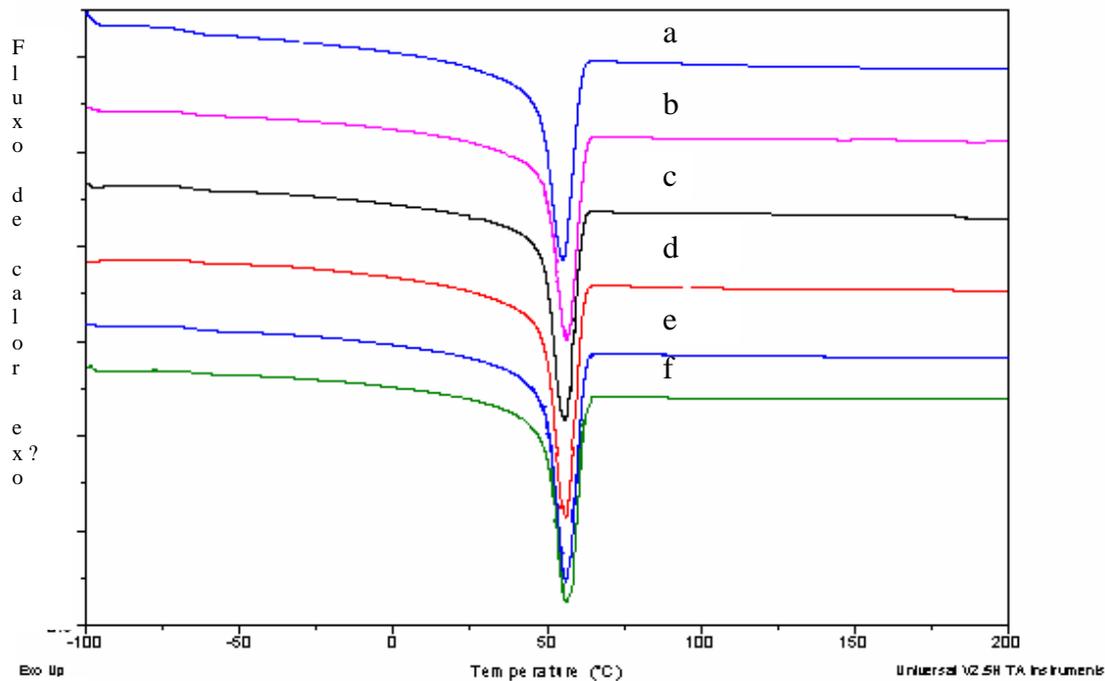


**Figura 6.9** Curvas de DSC para as blendas P(3HB)/PCL 80/20 após biodegradação em solo – [a] t = 0 dia, [b] t = 7 dias

A figura 6.10 mostra claramente que a PCL não sofre nenhuma alteração detectável por DSC em função do tempo de degradação estudado. Isso fica claro pela observação que a  $T_m$  e a  $T_g$  da PCL não sofrem nenhuma alteração até 62 dias. A entalpia de fusão da PCL também permanece constante para todos os tempos avaliados, mostrando que o grau de cristalinidade da PCL também permanece constante. É possível concluir, por essa técnica, que a PCL é o polímero que mais demora a se degradar, concordando com os resultados da análise visual (item 6.2.1).

Recentemente foi demonstrado que PCL-despolimerases de duas espécies de *Fusarium* hidrolisavam cutina em adição à PCL. Considerando que a PCL é um polímero sintético, não sendo descrita sua ocorrência na natureza, e que a expressão de PCL despolimerases foi induzida por monômeros de cutina, assumiu-se que a despolimerase da PCL é na verdade uma cutinase (MURPHY et al. 1996 *apud* JENDROSSEK *et al.*, 1996).

A degradação da PCL e seus copolímeros, *in vivo*, ocorre em pelo menos 2 estágios distintos. O primeiro estágio de degradação (reação não enzimática), com hidrólise aleatória das ligações éster autocatalisadas pelo terminal carboxil das cadeias poliméricas. A duração desse primeiro estágio é determinada pela massa molar do polímero bem como pela sua estrutura química. Quando a massa molar decresce até 5000, o segundo estágio inicia. O polímero se torna bem fragmentado e a erosão superficial enzimática ou a fagocitose contribuem para sua absorção (LI e VERT, 1995).



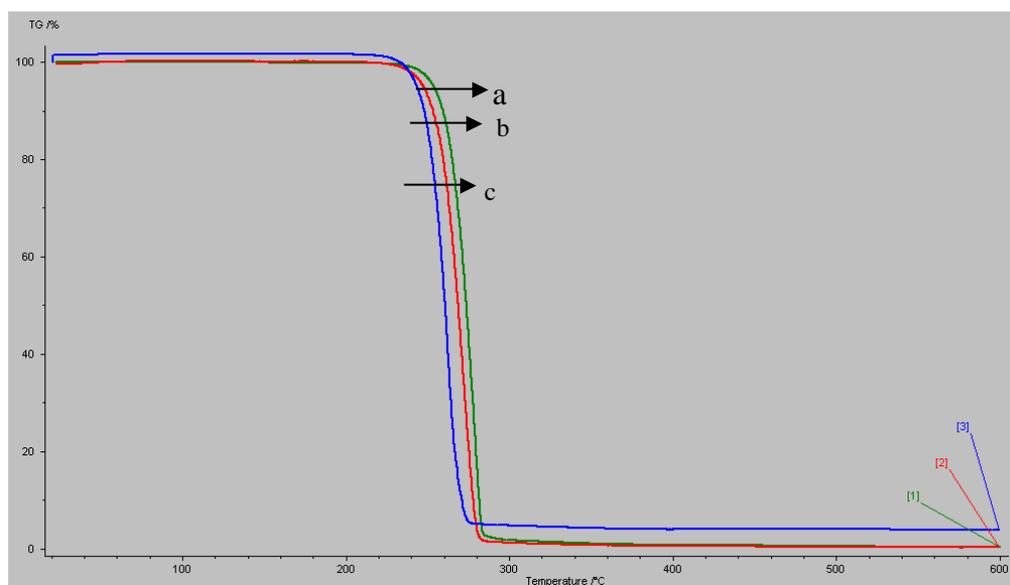
**Figura 6.10** Curvas de DSC para o homopolímero PCL após biodegradação em solo [a] t = 0 dia, [b] t = 7 dias, [c] t = 14 dias, [d] t = 21 dias, [e] t = 34 dias, [f] t = 62 dias

Pelas análises de DSC, é possível concluir que as composições P(3HB)/PCL 80/20 e 50/50 evidenciaram um aumento da entalpia de fusão da PCL com o tempo de degradação e o aparecimento de um segundo pico endotérmico da curva a uma temperatura maior. Tais resultados indicam um aumento do grau de cristalinidade, sugerindo que a degradação se inicia na parte amorfa; ao mesmo tempo, fica evidente que está ocorrendo um processo de recristalização, formando cristais mais perfeitos, que fundem a uma temperatura superior.

### 6.2.3 Análise termogravimétrica (TGA)

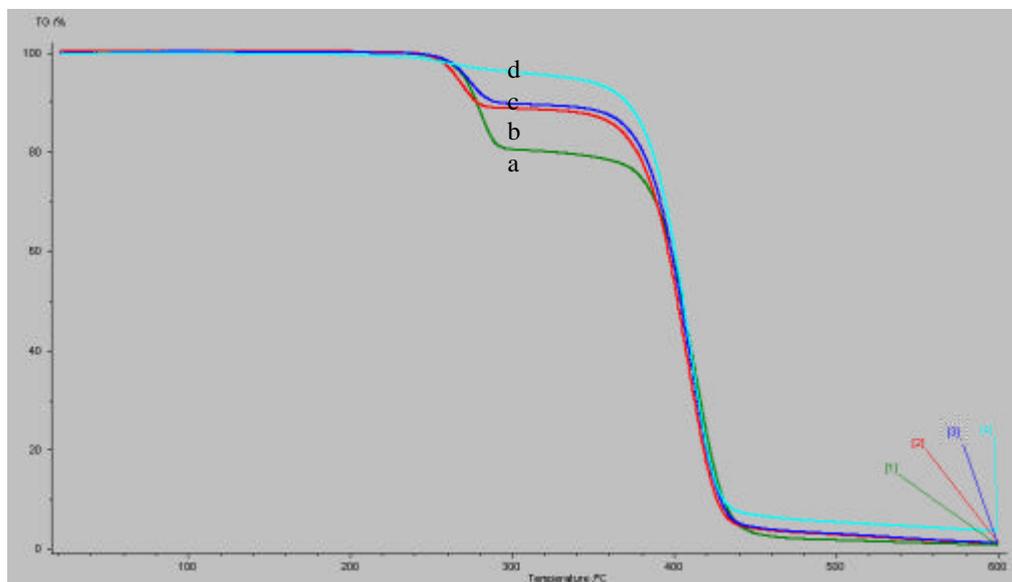
As curvas de TGA após a biodegradação em solo para P(3HB), P(3HB)/PCL 20/80, P(3HB)/PCL 50/50, P(3HB)/PCL 80/20 e PCL são apresentadas, respectivamente, nas figuras 6.11 a 6.14.

A figura 6.11, que ilustra as curvas de TGA do P(3HB) puro em vários tempos de degradação mostrou que os polímeros apresentaram diminuição da estabilidade térmica em função do aumento do tempo de degradação. Comparando-se os valores de temperatura de início de degradação, verificou-se que ocorre uma diminuição da  $T_i$  do P(3HB) com o tempo, confirmando o processo de degradação. Esse mesmo comportamento foi observado também para os valores de temperatura máxima de degradação.



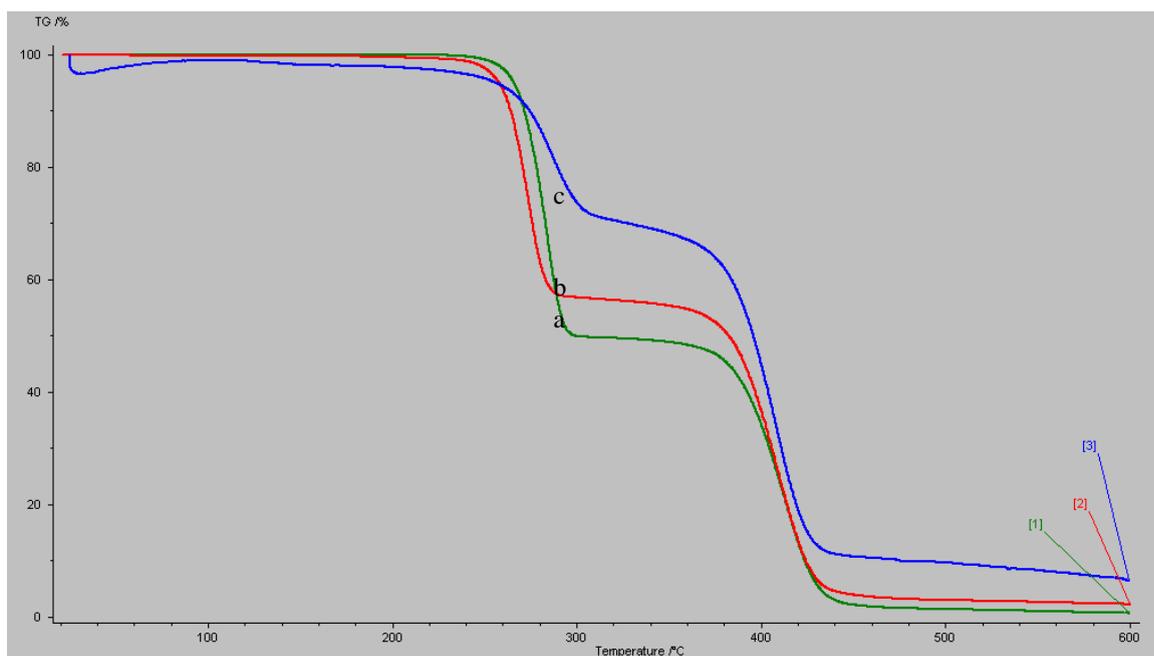
**Figura 6.11** Curvas de TGA para o homopolímero P(3HB) após biodegradação em solo [a] t = 0 dia, [b] t = 7 dias, [c] t = 14 dias

A figura 6.12 mostra que, após 14 e 21 dias, a porcentagem de P(3HB) (primeiro estágio de degradação) das blendas P(3HB)/PCL 20/80 decresceu cerca de 50% dos 20% contidos na blenda. Após 62 dias não se observou mais o estágio da degradação do P(3HB) (VOGELSANGER *et al.*, 2003).



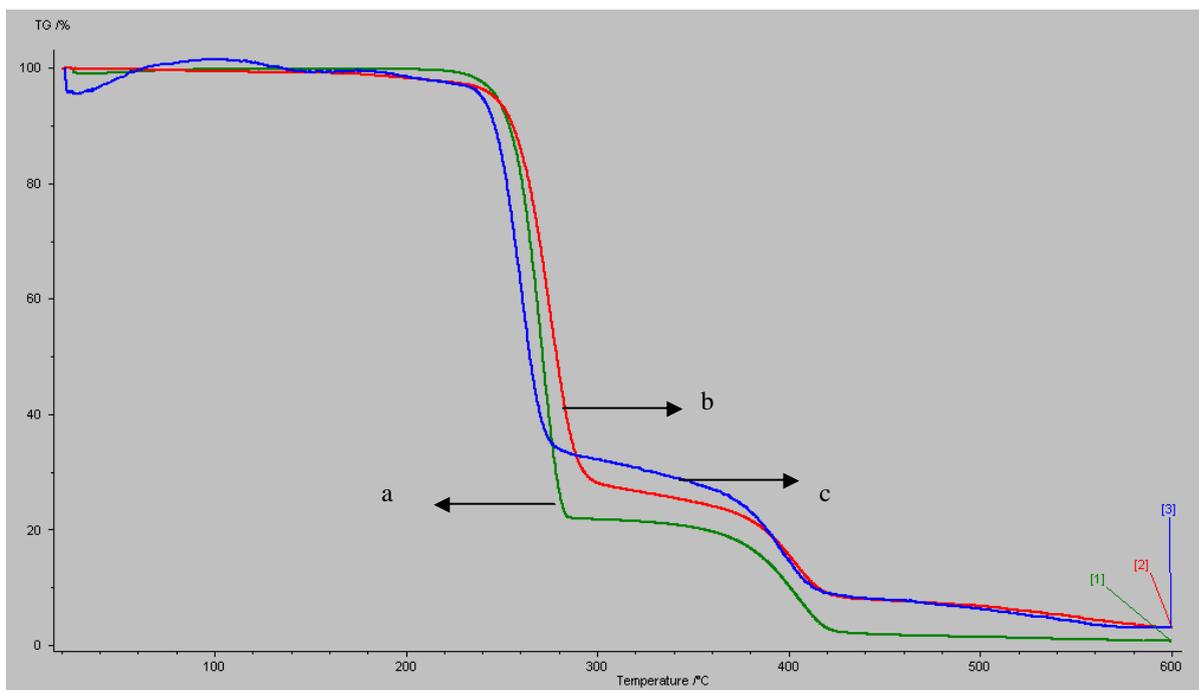
**Figura 6.12.** Curvas de TGA para as blendas P(3HB)/PCL 20/80 após biodegradação em solo – [a] t = 0 dia, [b] t = 14 dias, [c] t = 21 dias, [d] t = 62 dias

A figura 6.13 mostra que o comportamento térmico das blendas P(3HB)/PCL 50/50 foi similar ao observado para as blendas 20/80, ou seja, ocorreu uma diminuição de cerca de 50% da porcentagem de perda de massa de P(3HB) dos 50% contidos na blenda.



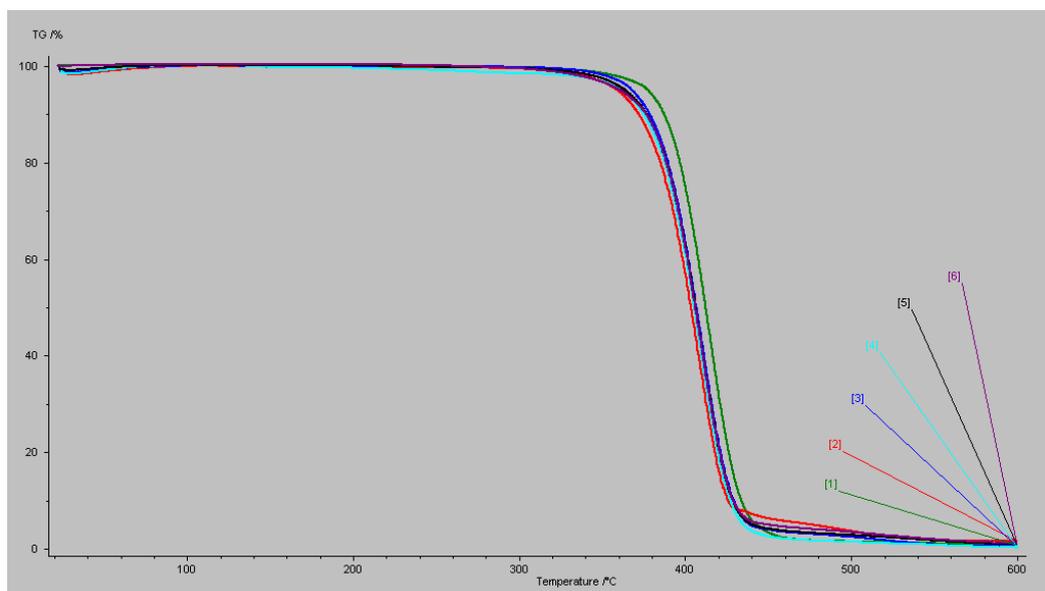
**Figura 6.13.** Curvas de TGA para as blendas P(3HB)/PCL 50/50 após biodegradação em solo – [a] t = 0 dia, [b] t = 7 dias, [c] t = 14 dias

Na figura 6.14 também se observou diminuição da porcentagem de perda de massa do P(3HB) para a blenda P(3HB)/PCL 80/20 em função do tempo de biodegradação.



**Figura 6.14.** Curvas de TGA para as blendas P(3HB)/PCL 80/20 após biodegradação em solo – [a] t = 0 dia, [b] t = 7 dias, [c] t = 14 dias

A figura 6.15 demonstra que, já na primeira semana, ocorre uma pequena variação da estabilidade térmica da PCL ( $T_i = 391^\circ\text{C}$ ), indicando o início do processo de biodegradação desse polímero. Entretanto, após o período referido, os termogramas mantêm-se estabilizados até 62 dias de biodegradação (cerca de  $T_i = 383^\circ\text{C}$ ), mostrando que este polímero possui taxa de biodegradação mais lenta, quando comparado com o P(3HB) e as blendas. Este resultado concorda com a análise visual (item 6.2.1), onde mostra que somente após 62 dias em solo a PCL inicia o processo de degradação com o aparecimento de colônias e deterioração da amostra.



**Figura 6.15.** Curvas de TGA para o homopolímero PCL após biodegradação em solo. [1] t = 0 dia, [2] t = 7 dias, [3] t = 14 dias, [4] t = 21 dias, [5] t = 34 dias, [6] t = 62 dias

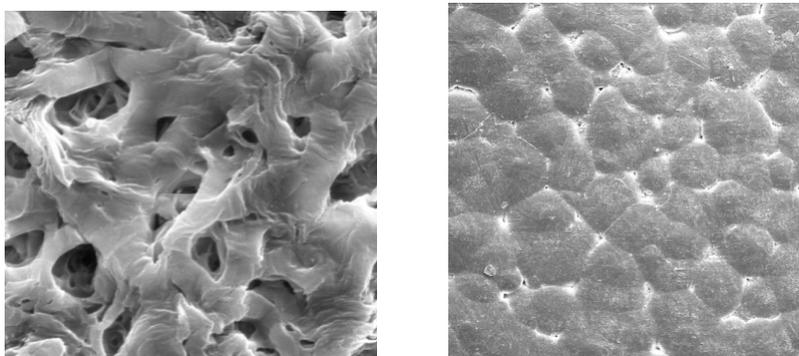
As análises termogravimétricas efetuadas evidenciaram, de uma forma geral, uma diminuição da estabilidade térmica tanto para o P(3HB) como para as blendas, independentemente da composição das mesmas, ao longo do tempo de degradação. Para a PCL, observou-se um princípio de degradação na primeira semana, permanecendo constante até os 62 dias observados. Quanto à blenda P(3HB)/PCL 20/80, verificou-se que após 14 e 21 dias, a porcentagem de P(3HB) decresceu cerca de 50% dos 20% contidos na blenda. Após 62 dias, não

se observou mais o estágio da degradação do P(3HB), o que indica, a completa degradação desse polímero na blenda (foi observado somente 0,29 % de perda de massa do P(3HB), confirmando os resultados observados também por DSC).

#### **6.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)**

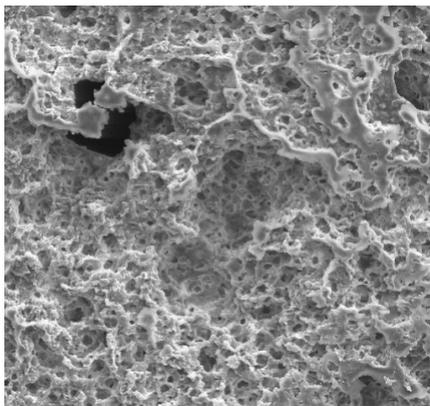
##### **6.2.4.1. Blendas após 7 dias de biodegradação em solo**

Após 7 dias de biodegradação em solo, não se observou por SEM nenhum sinal de degradação nos polímeros puros. As figuras 6.16a e 6.16b ilustram as morfologias do P(3HB) e da PCL, respectivamente. Já na composição P(3HB)/PCL 80/20 (figura 6.17) verificou-se uma superfície bastante danificada, sugerindo uma composição com alta capacidade de degradação, concordando os resultados da análise visual. A blenda P(3HB)/PCL 20/80 já apresentou uma pequena degradação superficial, principalmente no P(3HB), primeiro estágio de degradação (figura 6.18a e 6.18b). Observou-se uma nítida separação entre as fases sendo a matriz praticamente inalterada formada pela PCL e pequenas esferas de P(3HB) bastante degradadas.



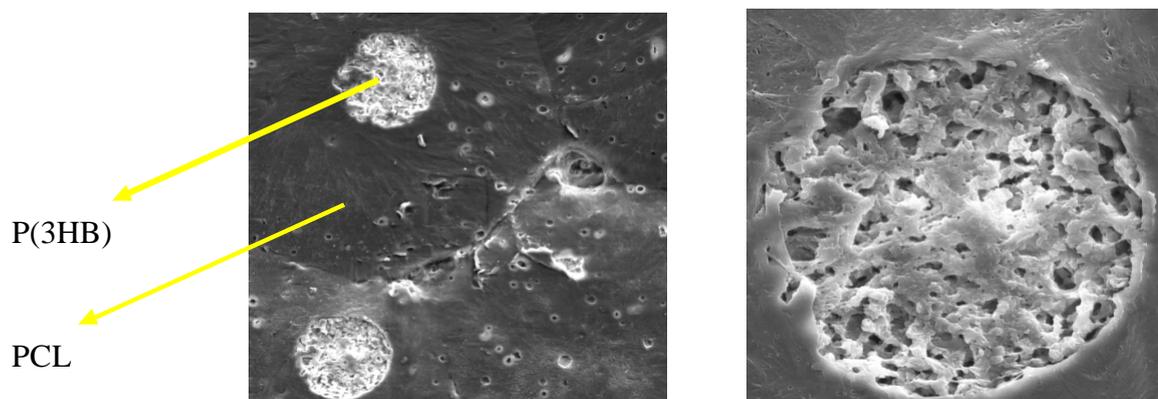
a) P(3HB) 5000x b) PCL 5000x

**Figura 6.16** Micrografias de SEM dos homopolímeros P(3HB) e PCL após 7 dias de biodegradação em solo



c) P(3HB)/PCL 80/20 500x

**Figura 6.17** Micrografias de SEM das blendas P(3HB)/PCL 80/20 após 7 dias de biodegradação em solo



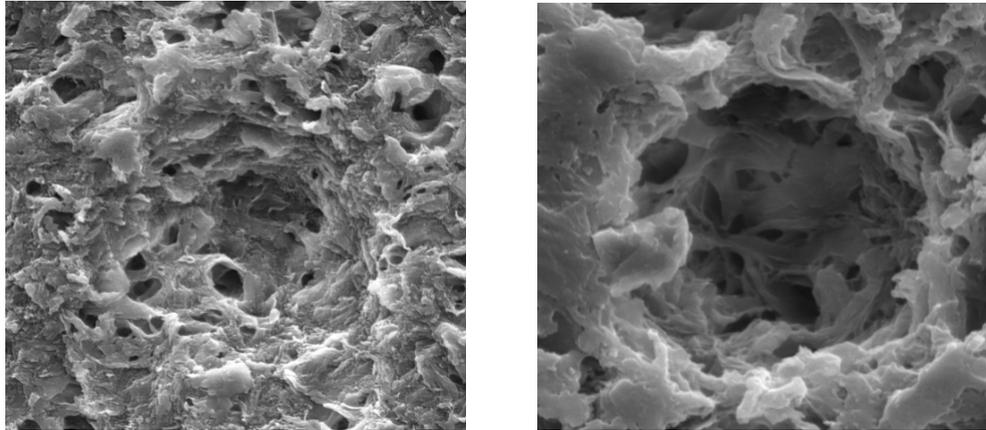
a) P(3HB)/PCL 20/80 500x b) P(3HB)/PCL 20/80 2000x

**Figura 6.18** Micrografias de SEM das blendas P(3HB)/PCL 20/80 após 7 dias de biodegradação em solo

#### 6.2.4.2 Blendas após 14 dias de biodegradação em solo

Após 14 dias de degradação, observou-se no homopolímero P(3HB) o aparecimento de alguns buracos, sugerindo o início de degradação do polímero (figura 6.19a). Outro exemplo é a blenda P(3HB)/PCL 80/20 que, com apenas 14 dias de

degradação, já se apresentou bastante deteriorada confirmando sua alta capacidade de degradação (figura 6.19b), como verificado também por outras técnicas.

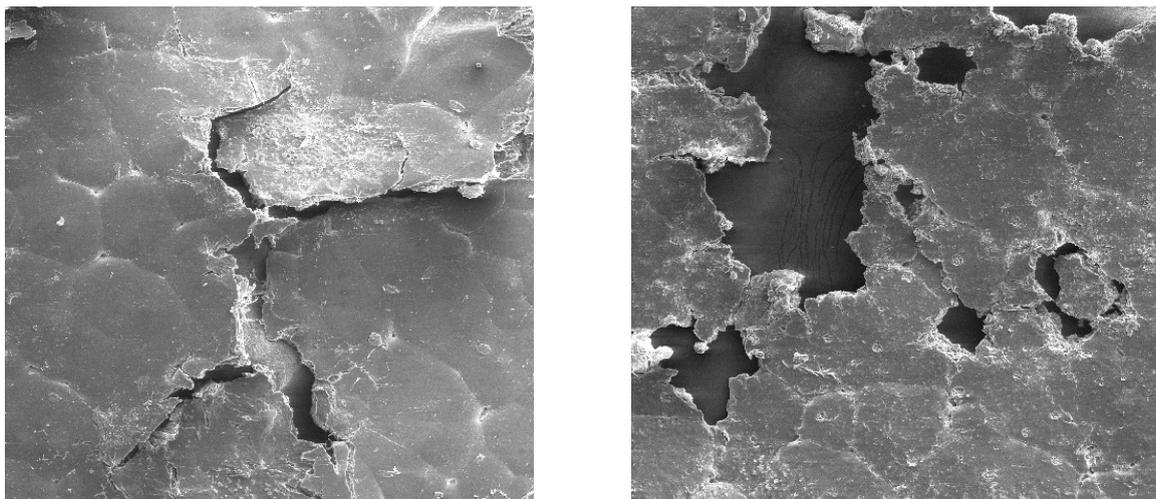


a) P(3HB) 3000 x b) P(3HB)/PCL 80/20 5000x

**Figura 6.19** Micrografias de SEM das blendas P(3HB) e P(3HB)/PCL 80/20 respectivamente após 14 dias de biodegradação em solo

#### **6.2.4.3** *Blendas após 34 dias de degradação em solo*

Após 34 dias de biodegradação em solo, somente as amostras PCL e P(3HB)/PCL 20/80 foram encontradas. As outras blendas foram totalmente degradadas nesse tempo. As micrografias da figura 6.20 mostram que o filme de PCL já apresentou grandes rachaduras, entretanto existe uma grande porção que ainda permanece intacta. Em outras micrografias, observou-se que a degradação se inicia preferivelmente na região que limita um polígono e outro, por ser talvez uma região mais frágil devido à existência de pequenos poros. Notou-se também um esbranquiçamento no filme, atribuído provavelmente ao aumento da cristalinidade.



a) PCL 34 dias 100 x

b) P(3HB)/PCL 20/80 34 dias 100x

**Figura 6.20.** Micrografias de SEM (superfície) de blendas P(3HB)/PCL após 34 dias de biodegradação em solo

Em um estudo sobre as blendas de P(3HB)/poli(óxido de etileno) (PEO) por evaporação de solvente, Avella e Martuscelli (1988), verificaram que as blendas eram miscíveis no estado amorfo. Kumagai e Doi (1992a) estudaram a degradação enzimática destas blendas em solução aquosa de P(3HB) despolimerase extracelular, produzida pela bactéria *Alcaligenes faecalis* T1, uma enzima isolada do lodo ativado como um microrganismo capaz de degradar o P(3HB) e verificaram que a taxa de biodegradação da blenda foi mais rápida que o P(3HB) puro, concluindo que a aceleração da biodegradação foi ocasionada pela solubilidade do PEO em água, formando buracos que facilitavam a maior atividade enzimática na blenda. Em outro trabalho, Kumagai e Doi (1992b), avaliaram a degradação enzimática de blendas de P(3HB)/PCL, sendo que ambos os polímeros são insolúveis em água. Eles constataram completa imiscibilidade, tanto na parte amorfa quanto na fase cristalina, através de dados de  $T_g$  e  $T_m$ , obtidos por DSC, e observaram que a blenda P(3HB)/PCL 77/23 também sofreu degradação enzimática mais rápida que o P(3HB) puro, concordando com os resultados obtidos neste trabalho.

## Considerações finais do capítulo

Após a realização dos trabalhos deste capítulo foi possível obter algumas informações importantes com respeito obtenção, caracterização, miscibilidade e biodegradação de blendas de P(3HB)/PCL.

❖ **A partir das análises de DSC para as blendas de P(3HB)/PCL, foram verificadas duas  $T_g$ 's e duas  $T_m$ 's ligeiramente deslocadas dos valores dos homopolímeros, permitindo classificar o sistema em estudo como parcialmente miscível tanto na fase amorfa quanto na cristalina. Entretanto as diferenças observadas não são muito significativas, caracterizando o sistema em questão mais próximo da imiscibilidade do que da miscibilidade.**

❖ Os resultados obtidos mostram que a cinética de biodegradação das blendas ocorreu na seguinte ordem: P(3HB)/PCL 80/20 > P(3HB)/PCL 50/50 > P(3HB) > P(3HB)/PCL 20/80 > PCL.

❖ Pela análise de DSC, observou-se para as composições P(3HB)/PCL 80/20 e 50/50 um aumento da entalpia de fusão da PCL e o aparecimento de um segundo pico endotérmico a uma temperatura maior. Esses resultados indicam um aumento do grau de cristalinidade, sugerindo que a degradação se inicia na parte amorfa e que está ocorrendo simultaneamente um processo de recristalização, formando cristais mais perfeitos, que se fundem a uma temperatura superior.

## CONCLUSÕES

Desde que PHAs são sintetizados e acumulados em condições de crescimento desfavoráveis e na presença de excesso da fonte de carbono, é importante desenvolver estratégias de cultivo que simulem essas condições e permitam uma produção eficiente de PHA. Assim, o desenvolvimento deste trabalho permitiu obter algumas conclusões quanto à síntese de P(3HB) por *Ralstonia eutropha*. Dentre as temperaturas testadas, 30°C e 37°C, visando o crescimento celular e a produção do polímero, foi observada uma maior produção de células a 37°C. A mudança de temperatura de 30°C para 37°C na fase de produção não acarretou variação em nenhum dos parâmetros avaliados.

Ácido oléico (AO), como suplemento nutricional, foi adicionado ao meio mineral contendo glicose e frutose com fonte principal de carbono em culturas de *Ralstonia eutropha*. Foi observado que, nas fases de crescimento e produção, concentrações crescentes de AO proporcionaram uma maior produtividade e conversão de substrato em polímero. O ácido oléico adicionado na fase de crescimento proporcionou um aumento percentual na produção de biomassa (residual) de 50%. O fator de conversão de substrato em células demonstrou que o ácido oleico foi também consumido na fase de exponencial do crescimento celular. Com a adição de 3,0g/L de ácido oléico ou equivalente em óleo de canola, o aumento da quantidade de P(3HB) produzida pode chegar a 100%, se adicionado nas duas fases.

Os filmes obtidos a partir do cultivo de *Ralstonia eutropha* em concentrações crescentes de AO foram caracterizados por calorimetria exploratória diferencial e análise termogravimétrica. Nenhuma variação significativa foi observada nos polímeros sintetizados em meio contendo 0 a 1,5 g/L de AO; no entanto o filme obtido em meio contendo 3.0 g/L de ácido oléico forneceu um filme com baixo grau de cristalinidade, baixa temperatura de transição vítrea e temperatura de fusão e baixa

estabilidade térmica. Embora se suspeitasse que o polímero obtido com adição de 3,0g/L de AO não fosse P(3HB), as análises de FT – IR sugeriram tratar-se do mesmo polímero.

A biodegradação em solo dos filmes de P(3HB) obtido por *Ralstonia eutropha* com o uso de ácido oléico como suplemento nutricional também foi avaliada.

A análise visual, por ser uma técnica qualitativa não forneceu informações suficientes para definir a taxa de degradação, não sendo possível afirmar qual concentração degradou mais rápido (0,3 ou 0,9g/L). Dessa forma, pode-se dizer que, aparentemente, a taxa de biodegradação foi maior com o aumento da concentração de ácido oléico durante sua síntese por *Ralstonia eutropha*, podendo ser representada da seguinte forma: 3,0g/L de AO > 1,5g/L de AO > 0,9g/L de AO ~ 0,3g/L de AO > 0g/L de AO. Este resultado foi confirmado pelas demais técnicas realizadas, sendo portanto, possível afirmar que a degradação foi mais acelerada na amostra contendo 0,9 g/L de AO em relação a amostra contendo 0,3 g/L de AO.

Embora o P(3HB) cristalize muito lentamente quando resfriado a partir da fusão, formando um material quebradiço, com a ajuda de plastificantes e agentes de nucleação, uma grande melhora no processamento pode ser alcançada. Para melhorar as propriedades físicas e térmicas do P(3HB), uma alternativa é a obtenção de blendas com outros polímeros biodegradáveis, tais como ésteres celulósicos, poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL). Assim, para finalizar este trabalho, blendas de P(3HB)/PCL em várias composições foram estudadas.

A partir das análises de DSC para as blendas de P(3HB)/PCL, foram verificadas duas  $T_g$ 's e duas  $T_m$ 's ligeiramente deslocadas dos valores dos homopolímeros, permitindo classificar o sistema em estudo como parcialmente miscível tanto na fase amorfa quanto na cristalina. Entretanto as diferenças observadas não são muito significativas, caracterizando o sistema em questão mais próximo da imiscibilidade do que da miscibilidade.

Os resultados obtidos mostraram que a cinética de biodegradação das blendas ocorreu na seguinte ordem: P(3HB)/PCL 80/20 > P(3HB)/PCL 50/50 > P(3HB) > P(3HB)/PCL 20/80 > PCL.

Pela análise de DSC, observou-se para as composições P(3HB)/PCL 80/20 e 50/50 um aumento da entalpia de fusão da PCL e o aparecimento de um segundo pico endotérmico a uma temperatura maior. Esses resultados indicam um aumento do grau de cristalinidade, sugerindo que a degradação se inicia na parte amorfa e que está ocorrendo simultaneamente um processo de recristalização, formando cristais mais perfeitos, que se fundem a uma temperatura superior.

As análises termogravimétricas evidenciaram uma diminuição da estabilidade térmica tanto para o P(3HB) como para as blendas, independentemente da sua composição, ao longo do tempo de degradação.

## SUGESTÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados deste trabalho levaram a uma série de questionamentos e possibilidades, que poderão ser abordados na continuidade deste estudo:

- ❖ Estudar a composição elementar de *R. eutropha* nas duas fases do crescimento microbiano, nas condições estudadas.
- ❖ Continuar o estudo em biorreator com diferentes estratégias de temperatura e adição de ácido oléico.
- ❖ Ampliar a faixa de temperatura a ser investigada, em cultivos em biorreator.
- ❖ Estudar a cinética de consumo de ácido oléico durante o cultivo.
- ❖ Aplicar a melhor condição de cultivo em culturas com alta densidade celular.
- ❖ Realizar ressonância magnética nuclear de próton (RMN  $H^+$ ) para todos os filmes sintetizados em decorrência da adição de ácido oléico.
- ❖ Isolar e caracterizar os microrganismos capazes de degradar o P(3HB).

## REFERÊNCIAS

- ABE, H.; DOI, Y. Structural effects on enzymatic degradabilities for poly[3-hydroxybutyric acid] and its copolymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, 25, p.185-192, 1999.
- AGNELI, J. A. M. **Degradação, estabilização e envelhecimento de polímeros**. I ENCONTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA E INOVAÇÃO EM MATERIAIS. São Carlos, 2000.
- AKIYAMA, M.; TAIMA, Y.; DOI, Y. Production of poly(3-hydroxyalkanoates) by a bacterium of the genus *Alcaligenes* utilizing long-chain fatty acids. **Applied Microbiol. Biotechnol.**, v.37, p.698-701, 1992.
- AKIYAMA, M.; TSUGE, T.; DOI, Y. Environmental life cycle comparison of PHA produced from renewable carbon sources by bacterial fermentation. **Polymer Degradation and Stability**. v.80, p.183-194, 2003.
- AHN, W. S.; PARK, S. J.; LEE, S. Y. Production of poly[3-hydroxybutyrate from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology letters**, 23, p.235-240, 2001.
- AVELLA, M.; MARTUSCELLI, E. **Polymer**, 29, 1988.
- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbial Review**, 54, p.450-472, 1990.
- ARAGÃO, G. M. F. de. **Production de poly-β-hydroxyalkanoates par *Alcaligenes eutrophus*: caractérisation cinétique et contribution à l'optimisation de la mise en oeuvre des cultures**. Toulouse. These du Doctorale (Sciences de la Vie), L'institut National des Sciences appliquées de Toulouse.
- ARRUDA, J.; ANTÔNIO, R. V. Produção de P(3HB) por *Escherichia coli* recombinante em substrato de baixo custo: análise de possíveis alterações em parâmetros físico-químicos. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES – SINAFERM. **Anais...** 2003. CD-ROM.
- ASENJO, J. *et al.* Effect of single nutrient limitation on poly-β-hydroxybutyrate molecular weight distribution in *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnol and Bioengineer**. v.46, p. 497-502, 1995.
- ASRAR e GRUYS. Biodegradable Polymer. In: STEINBÜCHEL, A.; DOI, Y. **Biopolymers**. v.4. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.
- BLOEMBERGEN, S. D. A. *et al.* Studies of composition and cristalinity of bacterial poly(β-hydroxybutyrate-co-β-hydroxyvalerate). **Macromolecules**, 19, p.2865-2871, 1986.
- BOURQUE, D.; OUELLETTE, B.; ANDRE, G.; GROLEAU, D. Production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) from methanol: characterization of a new isolate of *Methylobacterium extorquens*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 37, p.7-12, 1992.
- BRANDL, H.; BACHOFEN, R.; MAYER, J.; WINTERMANTEL, E. Minireview: Degradation and applications of polyhydroxyalkanoates. **Can. J. Microbiol.**, 41, p.143-153, 1995.
- BRAUNNEG, G.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTY, R. M. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-β-hydroxybutyric acid in microbial biomass. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 6, p.29-37, 1988.
- BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Review article: Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, 65, p.127-61, 1998.

- BUCCI, B. Z.; TAVARES, L. B. B.; SELL, I. PHB packaging for the storage of food products. **Polymer Testing**, 24, p.564-571, 2005.
- BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms; technology and economics. **Trends Biotechnology**, 5, p.246-250, 1987.
- BYROM, D. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutirate: poly- $\beta$ -hydroxybutirate copolymers. **FEMS Microbial Reviews**, 103, p.247-250, 1992.
- CANEVAROLO, S.V. **Ciência dos Polímeros**: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. São Paulo: ArtLiber Editora, 2002.183 p.
- CHANDRA, R.R. Biodegradable Polymers. **Program of Polymer Science**, v.23, p. 1273-1335, 1998.
- CHIELLINI, E; SOLARO, R. Biodegradable polymeric materials. **Advanced Materials**, 8, n.4, 1996.
- CHOI; LEE, S.Y. Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. **Bioprocess Engineering**, 17, p.335-342, 1997.
- DALCANTON, F. **Produção, extração e caracterização de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* em diferentes substratos**. Florianópolis. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.
- DOELLE, H. W. **Bacterial metabolism** New York: Academic Press, 1975.
- DOI, Y.; KANESAWA, Y.; KUNIOKA, M.; SAITO, T. Biodegradation of microbial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). **Macromolecules**, 23, p.26-31, 1990.
- DUARTE, M.A.T. **Estudo do processamento e da degradação térmica do poli(3-hidroxibutirato) e de suas blendas com poli(e-caprolactona)**. Joinville. Dissertação de Mestrado (Engenharia em Ciências e Engenharia de Materiais), Universidade do Estado de Santa Catarina, 2004.
- DUARTE, HUGEN, R.; MARTINS, E.; PEZZIN, A.P. PEZZIN, S. H. Thermal and mechanical behavior of injection molded poly(3-hydroxybutyrate)/poly(e-caprolactone) blends. **Materials Research**. v.9, n.1, p. 25-27. 2006.
- EGUIBURU, *et al.*, Blends of amorphous and crystalline polylactides with poly/methyl/methacrylate and poly(methylacrylate) a miscibility study. **Polymer**. V.39, n.26, p.6894-6897,1998.
- ENGELBERG, J.; KOHN, J. Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: A comparative study, **Biomaterials**, v.12 (3), p.292-304, 1995.
- FORMOLO, M. C.; PEZZIN, A. P. T.; SCHNEIDER, A. L. S.; EINLOFT, S. M. . Verificação da influência de óleos vegetais na obtenção de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha*.. In: **IX Seminário de Iniciação Científica de Univille**, 2005, Joinville. Caderno de Iniciação à Pesquisa. Joinville : Editora da Univille, 2004. v. 6. p. 56-59.
- FORMOLO, M. C.; VOGELSANGER, N.; SCHNEIDER, A. L. S.; PEZZIN, A. P. T.; FURLAN, S. A. Obtenção, caracterização e biodegradação em solo de poli(3-hidroxibutirato) In: VI SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA., 2002, Joinville. **Anais...** Joinville: Editora UNIVILLE, 2003.
- FORMOLO, M. C. ; CAPANEMA, D. ; GRIGULL, V. H. ; APATI, G. ; FURLAN, S. A. ; SCHNEIDER, A. L. ; ARAGÃO, G. M. F. ; PEZZIN, A. P. T. . Nova estratégia para extração de poli(3-hidroxibutirato) sintetizado por *Ralstonia eutropha*. In: VIII Congresso Brasileiro de Polímeros (CBPOL), 2005, Águas de Lindóia. VIII Congresso Brasileiro de Polímeros (CBPOL), 2005.

- FUKUI, T.; DOI, Y. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. **Applied Microbiol and Biotechnol**, v. 49, p.333-336, 1998.
- GALEGO, N.; ROZSA, C.; SANCHEZ, R.; FUNG, J.; TOMAS, J. S. Characterization and application of PHA family as composite materials. **Polymer Testing**, v.19, p.485-492, 2000.
- CAPANEMA, D.; SCHNEIDER, A. L. S.; GULL, V. ; FORMOLO, M. C. ; FURLAN, S. ; ARAGAO, G. M. F. ; PEZZIN, A. P. T. . Efeito da Cocnetração de ácido oleico sobre o crescimento e produção de P(3HB) por *Ralstonia eutropha*. In: **8º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2005**, Águas de Lindóia. Anais do 8º congresso Brasileiro de Polímero, 2005. p. 630-631.
- GASSNER, F.; OWEN, A. J. On the physical properties of Biopol/EVA blends. **Polymer**, v.33 (12), p.2508-2512, 1992.
- GASSNER, F.; OWEN, A. J. Physical properties of poly( $\beta$ -hidroxybutyrate)-poly( $\epsilon$ -caprolactone) blends. **Polymer Report**, v.35, p.2233-2236, 1994.
- GUILLET, J. E. *et al.* Studies of the biodegradation of synthetic plastics. In: Biodegradable Polymers and Plastics (ed. M. Vert *et al.*). **Royal Society of Chemistry**, Cambridge, p.73-92, 1992.
- GILDING, D. K. Biodegradable polymers. **Biocompat. Clin. Implant. Mater.**, v.2, p.209-232, 1981.
- GOMES, J. G. C.; BUENO NETTO, C. L. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. **Revista Brasileira de Eng. Química**, 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 P(3HB-co-3HV) by isolated bacterial able to use sucrose. **Microbiol.**, 28, p.43-48, 1997.
- GROTHER, E.; MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y. Fermentation optimization for the production of poly( $\beta$ -hidroxybutyric acid) microbial thermoplastic. **Enzyme and Microbiol. Technology**, 25, p.132-141, 1999.
- HABRAK, O. Industrial production of poly- $\beta$ -hidroxybutyrate. **Fems Microbiol. Reviews**, 103, p. 251-256, 1992.
- HAGE, E. **Compósitos e blendas poliméricas**, 1989. (Apostila)
- HIGGINS, D.; BEST, J.; JONES, J. **Biotechnology – principle and applications**. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1995.
- HOLLAND, S. J. *et al.* Polymers for biodegradable medical devices. 1. The potencial of polyesters as controlled macromolecular release systems, **J. Control. Rev.**, v.4, p.155-180, 1986.
- HOLMES, P.A. Applications of PHB – a microbially produced biodegradable thermoplastic. **Phys. Technol.** V.16, p. 32-36, 1987.
- HUANG, S. J. Polymer waste management. Biodegradation, incineration, and recycling. **J.M.S. - Pure Appl. Chem.**, A32(4), p.593-597, 1995.
- IWATA, T. Strong Fibers and Films of Microbial Polyesters. **Macromol Biosci.** 12;5(8):689-701.2005.
- JENDROSSEK, D.; SCHIRMER, A.; SCHLEGEL, H. G. Biodegradation of polyhydroxyaldanoic acids. Mini-review. **Appl Microbial Biotechnol.**, 46, p.451-456, 1996.

JONAS, R.; FARAH, L. F. Production and application of microbial cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, 59, p.101-106, 1998.

JUSTI, T. Vida curta para o plástico. **IPESI-Química e Petróleo**, 28-29, abril/maio, 1991.

KAHAR, P.; TSUGE, T.; TAGUCHI, K.; DOI, Y. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. **Polymer Degradation and Stability**, v. 83, p.79-86, 2004.

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

KELEN, T., **Polymer degradation**. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1983. p.211.

KIM, P. S.; LEE, S. C.; LEE, S.Y.; CHANG, H. N.; CHANG, Y. K.; WOO, S. I. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. **Biotechnology and Bioengineering**, 43, p.892-898, 1994.

KIM, M.; LEE, A. R.; YOON, J.; CHIN, I. Biodegradation of PHB, Sky-Green and Mater-Bi by fungi isolated from soils. **European Polymer Journal**, v.36, p.1677-1685, 2000.

KIM, D.Y.; RHEE, Y.H. Biodegradation of microbial and synthetic polyesters by fungi. **Applied Microbiol. Biotechnol.**, v.61, p. 300-308, 2003.

KOYAMA e DOI, Miscibility of binary blends of poly(R)- 3-hydroxybutyric acid and poly (S) lactic acid. **Polymer**, v.38, n.7, p. 1589-1593.1996.

KUMAGAI, Y.; DOI, Y., **Polymer degradation and stability**, v.35, p.87, 1992a.

KUMAGAI, Y.; DOI, Y. Enzymatic degradation of binary blends of microbial poly(3-hydroxybutyrate) with enzymatically active polymers. **Polymer Degradation and Stability**, 37, p.253-256, 1992.

KUNIOKA, M.; KAWAGUSHI, Y.; DOI, Y. Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutropha*. **Applied Microbiol. Biotechnol.**, v. 30, p.569-573, 1989.

KRUPP, L. R.; JEWELL, W. J. Biodegradability of modified plastics films in controlled biological environments. **Environ. Sci. Technol.**, 26, p.193-198, 1992.

LAGEVEEN, R. G. *et al.* Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly- (R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkanoates. **Appl. Environ. Microbiol.**, 54, p.2924-2932, 1988.

LEE, S. Y. Plastic bacteria – progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Trends Biotechnology**, 14, p.437-438, 1996a.

LEE, S. Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Review: **Biotechnology and Bioengineering**, 49, p.1-14, 1996b.

LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Production of poly(hydroxyalkanoic acid). Review. **Biotechnology**, 52, p.28-57, 1995.

LEE, S.Y.; CHOI, J.; WONG, H.H. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.25, p. 31-36, 1999.

LEE, S. Y.; WONG, H. H.; CHOI, J.; LEE, L. H.; LEE, S. C.; HAN, C. S. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by high-cell-density cultivation of *Pseudomonas putrida* under phosphorus limitation. **Biotechnology and Bioengineering**, 68, n.4, 2000.

- LARATONDA, F.; MATSUI, K.; SOLDI, V.; LAURINDO, J. B. Biodegradable films made from raw and acetylated cassava starch. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n.3, p.477-484, 2004.
- LI, S. e VERT, M. Biodegradation of aliphatic polyesters. In: SCOTT, G. e GILEAD, D. **Degradable Polymers**. London: CHAPMAN & HALL, 1995.
- LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E. Caracterização de Polímeros. In: **Caracterização espectroscópica e cromatográfica de copoliésteres biodegradáveis**. Joinville. Dissertação de Mestrado (Ciência e Engenharia dos Materiais), Universidade do Estado de Santa Catarina, 2005.
- LUENGO, J.; GARCIA, B.; SANDOVAL, A.; NAHARRO, G.; OLIVERA, E. Bioplastics from microorganisms. **Current Opinion in Microbiol**, v.6, p.251-260, 2003.
- LUONG, J. H. T.; MULCHNDANI, A.; LEDUY, A. Batch kinectis of microbial polyssacharide biosynthesis. **Biotechnol. and Bioeng.**, 31, p.639-646, 1988.
- MADDEN, *et al.* Production and characterization of P(3HB)-*co*-3HV synthesized by *Ralstonia eutropha* in fed batch cultures. **Polymer**, v.41, p. 3499-3505, 2000.
- MANO, E. B. **Polímeros como materiais de engenharia**. 2. reimp. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2000. 197 p.
- MANO, E. B. e MENDES, L.C. **Introdução à Polímeros**. 2. reimp. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2004. 191 p.
- MANSON, J. A.; SPERLING, L. H. **Polymer blends and composites**. New York: Plenum Press, 1976.
- MARANGONI, C. **Estudo de estratégias de produção de poli(3-hidroxiбутирато) por *Ralstonia eutropha* utilizando substrato de baixo custo e ácido propiônico**. Florianópolis. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.
- MARANGONI, C.; FURIGO Jr., A.; ARAGÃO, G. M. F. Oleic acid improves poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerte) by *Ralstonia eutropha* in inverted sugar and propionic acid. **Biotechnology Letters**, 22, p.1635-1638, 2000.
- MARANGONI, C.; FURIGO Jr., A.; ARAGÃO, G. M. F. The influence of substrate source on the growth of *Ralstonia eutropha*, aiming at the production of polyhydroxyalkanoate. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 18, p.175-180, 2001.
- MARCHESSAULT, R. e YU, GA-ER. Crystallization and material properties of polyhydroxyalkanoates. In: STEINBÜCHEL, A.; DOI, Y. **Biopolymers**. v.3b. Weinheim: WILEY-VCH, 2002
- MARTELLI, S. M.; MOORE, G.; PAES, S. S.; GANDOLFO, C.; LAURINDO, J. B. Influence of plasticizers on water sorption isotherms and water vapor permeability of chicken feather keratin films. Article in press. **Swiss Society of Food Science and Technology**, 2005.
- MERGAERT, *et al.* microbial degradation of P(3HB) e P(3HB)-*co*-3HV in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 3233-3238, 1993.
- MERRICK, J. Microbial Water-insoluble aliphatic polyesters (PHA). In: STEINBÜCHEL, A.; DOI, Y. **Biopolymers**. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.
- MILLER, G.L. **Analytical Chemistry**, v.31, p. 426-428, 1959.

- NISHIDA, H.; TOKIWA, Y. Distribution of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) aerobic degrading microorganism in different environments, **J. Environ. Polym. Degrad.**, 1, p.227-233, 1993.
- OJUMU, T.V. e SOLOMON, B.O. Production of poluhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. **African Journal of Biotechnology**, v.3 (1),p. 18-24, 2004.
- ORTS, W. J.; MARCHESSAULT, R. H.; BLUHM, T. L. Thermodynamics of the melting point depression in poly( $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate) copolymers. **Macromolecules**, 24, p.6435-6438, 1991.
- PAGE, W. Production of PHA by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses culture. **Fems Microbiol. Reviews**, 103, p. 144-158, 1992.
- PANTANO FILHO, R.; ROSA, D.S.; CHUI, Q.S.; AGNELLI, J.A.M. Avaliação da biodegradação de PHB, PHB-V e PCL em solo compostado. In: IX International Macromolecular Colloquium e 6º congresso Brasileiro de Polímeros, 2001, gramado-RS. **Anais do IX Congresso Macromolecular Colloquium e 6º Congresso Brasileiro de Polímeros**. São Carlos: Associação Brasileira de Polímeros, 2001, p. 1244 – 1247.
- PAUL, D. R.; NEWMAN, S. **Polymer blends**. Orlando: Academic Press, Inc., 1978.
- PELZAR, Jr. M. J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia - conceitos e aplicações**. Vol I e II. 2. Ed. Makron Books.1997.
- PEZZIN, A.P.T.; ZAVAGLIA, C.; DUEK, E.A.R. Polímeros. **Ciência e Tecnologia**, v.12, n.4, p. 285-294, 2002.
- PEZZIN, A.P.T. **Obtenção e caracterização de blendas de poli (p-dioxanona)/poli (L-ácido láctico) (PPD/PLLA) para aplicação como prótese de menisco bioreabsorvível**. Campinas. Tese de Doutorado (Engenharia Mecânica), Universidade Estadual de Campinas, 2001.
- POIRIER, Y.; NAWRATH, C.; SOMERVILLE, C. Production of poluhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers in bacteria and plants. **Biotechnology**,13, 1995.
- POTTS, J. E. **Aspects of degradation and stabilization of polymers**. Amsterdam: H.H.G. Jellinek. Elsevier Scientific,1978. p.617.
- POTTS, J. E. *et al.* The biodegradation of synthetic polymers. **Chem. Soc. Polym. Prepr.**, 13, p.629-633, 1972.
- PREUSTING, H.; KINGMA, J.; WITHOLT, B. Physiology and polyester formation of *Pseudomonas oleovorans* in continuous two-liquid-phase cultures. **Enzyme microbial biotechnol**, 13, 1990.
- QUENTAL, A. C.; FELISBERTI, M. I.In: 6º CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, **Anais...**, 2001. p.1260-1263.
- RAGHAVAN, D. Characterization of biodegradable plastics. **Polym. Plast. Technol. Eng.** 34, n.1, p.41-63, 1995.
- RAMSAY, B. A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBÉ, B.; BATAILLE, P.; RAMSAY, J. A. Production of poly-( $\beta$ -hydroxybutiric-co- $\beta$ -hydroxyvaleric) acids. **Environ. Microbiol.**, 56, p.2093-2098, 1990.
- RAMSAY, J.; HASSAN, M. C. A.; RAMSAY, B. Hemicellulose as a potencial substrate for production of poly( $\epsilon$ -hydroxyalkanoates). **Can. J. Microbiol.**, 41 (Suppl. 1), p.262-266, 1995.
- REICH, L.; STIVA, S. S., **Elements of polymer degradation**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1971. p.361.

- REE, Y. H.; KIM, G. J.; YUN, K. Y.; BAE, K. S. Accumulation of copolyesters consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes sp* SH – 69 in batch culture. **Biotechnology Letters**, 14, p.27-32, 1992.
- REEVE, M. S.; MC CARTHY, S. P.; GROSS, R. A. Preparation and characterization of (R)-poly(b-hydroxybutyrate)-poly( $\epsilon$ -caprolactone) and (R)-poly(b-hydroxybutyrate)-poly(lactide) degradable diblock copolymers. **Macromolecules**, 26(5): 888-894, 1993.
- REDDY, C. S. K. *et al.* Polyhydroxyalkanoate: an overview. **Review paper. Elsevier** 87: 137 -146, 2003.
- REHM, H. J.; REED, G. **Biotechnology**. v.6. Weinheim: VCH, 1988.
- REIS, R. L.; CUNHA, A. M. Characterization of two biodegradable polymers of potential application within the biomaterials field. **Journal of Materials in Medicine**, 6, p.786-792, 1995.
- REIS, M. M.; SERAFIM, L. S.; LEMOS, P. C.; RAMOS, A. M.; AGUIAR, F. R.; VAN LOOSDRECHT. **Bioprocess Biosyst Eng**. v.25, p.377-385, 2003.
- REPASKE, R.; MAYER, R. Dense autotrophic cultures of *Alcaligenes eutrophus*. **Applied and Environmental Microbiol**. P. 592 -597, 1976.
- REUTZ, I.; SCHOBERT, P.; BOWIEN, B. Effect of phosphoglycerate mutase deficiency metabolism of *Alcaligenes eutrophus*. **Journal Bacteriol**, 151, p.8-14, 1982.
- RODRIGUES, R. C. **Condições de cultura para a produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* a partir de resíduos de indústrias de alimentos**. Florianópolis. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.
- ROELS, J.A. **Energetics and kinetics biotechnology**. Elsevier Biomedical. 1983.
- ROSA, D. S.; ROSA, M. I. F. P. S.; CARRARO, G.; PENTEADO, D. F. Caracterização das propriedades térmicas e morfológicas de polímeros biodegradáveis. **Projeções**, Bragança Paulista, 7, p.85-90, 1999.
- ROSA, D. S. *et al.* Propriedades térmicas e biodegradabilidade de PCL e PHB em um *pool* de fungos. **Revista de Ciência & Tecnologia**, v.15, p.75-80, 2000.
- RYU, H. W.; HAHN, S. K.; CHANG, Y. K.; CHANG, H. N. Production of poly(3hydroxybutyrate) by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. **Biotechnology and Bioengineering**, 55. n.1, 1997.
- SANTOS, C. E. O.; RODRIGUES, T. C.; ROSA, D. S.; CALIL, M. R. O efeito da irradiação UV-B na biodegradação dos polímeros PCL e PHB. In: 6º CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS. **Anais...** Belo Horizonte: Associação Brasileira de Polímeros, 2001.
- SAVENKOVA, L.; GERBERGA, Z.; MUTER, O.; TUPURCINA, V. Accelerated biodegradation of PHB. **Process Biochemistry**, v.36, p.445-450, 2000.
- SAVENKOVA, L.; GERBERGA, Z.; MUTER, O.; TUPURCINA, V. PHB-based films as matrice for pesticides. **Process Biochemistry**, v.37, p.719-722, 2002.
- SCANDOLA, M.; FOCARETE, M. *et al.* Polymer blends of Natural poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and a synthetic atactic poly(3-hydroxybutyrate). **Macromolecules**. v.30, p. 2568-2574, 1997.
- SCHNEIDER, A. L. S. ; MERKLE, R. ; CARVALHOJONAS, M. F. ; JONAS, R. ; FURLAN, S. A. . Oxygen transfer on  $\beta$ -D-galactosidase production by *Kluyveromyces marxianus* using

sugar cane molasses as carbon source. **Biotechnology Letters**, Inglaterra, v. 23, p. 547-550, 2001.

SCHUBERT, P.; STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, H.Y. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes of synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. **Journal Bacteriol.**, 170, p.5837-5847, 1988.

SCOTT, G. e GILEAD, D. **Degradable Polymers**. London: CHAPMAN & HALL, 1995.

SHAHHOMSSEINI, S. Simulation and optimization of PHB production in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha*. **Process Biochemistry**. v.39, p. 963-969, 2004.

SHIMIZU, H. *et al.*, Kinetic study of P(3HB) production and its molecular weight distribution control in a fed-batch culture of *A. eutrophus*. **Journal of Ferm. and Bioeng.**, v.17, n.6, p. 465-469, 1993.

SILVA, L. F.; WADA, M. A. A.; KLOSS, J.; GOMEZ, J. G. C.; ZAWADZSKI, S.; WANG, S. H.; AKCELRUD, L. Avaliação da biodegradabilidade de poli(e-caprolactona-b-poliuretano) através do teste STURM. In: 6º CONGRESSO DE POLÍMEROS. **Anais...** Belo Horizonte: Associação Brasileira de Polímeros, 2001.

SCHNEIDER, A. L. S. ; PEZZIN, A. P. T. ; FORMOLO, M. C. ; EINLOFT, S. M. . Verificação da influência de óleos vegetais na obtenção de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha*. In: **IX Seminário de Iniciação Científica de Univille**, 2005, Joinville. Caderno de Iniciação à Pesquisa. Joinville : Editora da Univille, 2004. v. 6. p. 56-59.

SONNLEITER, B. *et al.* Formal kinetics of P(3HB) production in *Alcaligenes eutrophus* H16 and *Mycoplana rubra* R14 with respect to the dissolved oxygen tension in ammonium-limited batch cultures, v.2, p. 1-10, 1979.

SQUIO, C.; MARANGONI, C.; DE VECCHI, C. ARAGÃO, G. Phosphate feeding strategy during production phase improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) storage by *Ralstonia eutropha*. **Applied Microbiol Biotechnol**. v. 61, p.257-260, 2003.

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

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

STEINBÜCHEL, A.; DOI, Y. **Biopolymers**. v.3. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.

SUAVE, J. ; MEIER, M. M. ; PEZZIN, A. P. T. ; SILVA, D. A. K. ; SOLDI, V. . Biodegradable microspheres of P(3HB)/PCL: preparation, characterization and release of the pesticide malathion. In: X International Macromolecular Colloquium, 2005, Gramado. **Proceedings X International Macromolecular Colloquium**, 2005.

SUDESH, K.; FUKUI, T.; TAGUCHI, K.; IWATA, T.; DOI, Y. Improved production of poly(4-hydroxybutyrate) by *Comamonas acidovorans* and its freeze-fracture morphology. **Intern. Journ. of Biological Macromolecules**, 25, p.79-85, 2000.

SUZUKI, T.; DEGUCHI, H.; YAMANE, T.; SHIMIZU, S.; GEKKO, K. Control of molecular weight of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid produced in fed-batch culture of *Protomonas extorquens*. **Appl. Microbiol Biotechnol.**, 27, p.487-491, 1988.

TACIRO, M. K.; PEREIRA, R. P. M.; PRADELLA, J. G. C.; BUENO NETTO, C. L.; SIMÕES, D. A. Poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate accumulation at different strategies of substrate feeding. **Rev. Microbiol.**, 28, p.49-53, 1997.

TAGUCHI, S.; NAKAMURA, H.; KICHISE, T.; TSUGE, T.; YAMATO, I.; DOI, Y. Production of PHA from renewable carbon sources in recombinant *Ralstonia eutropha* using mutants of original PHA synthase. Article in press. **Biochemical Eng. Journal**, v. 3725, p.1-7, 2003.

- TANAKA, K.; ISHIZAKI, A.; KANAMARU, T.; KAWANO, T. Production of poly-(D-3-hydroxybutyrate) from CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> by high cell density autotrophic cultivation of *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnol. Bioeng.**, 45, p.268-275, 1994.
- TOKIWA, Y. PRANAMUDA, H. Microbial Degradation of aliphatic polyesters. In: STEINBÜCHEL, A.; DOI, Y. **Biopolymers**. v.3. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.
- TORTORA, G; FUNKE, B.R. CASE, L.L. **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artes Médicas.
- 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.
- VANIN, M.; SANTANA, C.; TORRIANI, I.; PRIVELIC, I.; DUEK, E. Estudo da degradação “in vitro” de blendas de poli(β-hidroxibutirato) (PHB)/poli(L-ácido láctico) (PLLA) na forma de filmes. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.14, n.3, p.187-193, 2004.
- VASCONCELOS, Y. Plástico de açúcar. **Pesquisa FAPESP**, outubro/2002.
- VOET, D. E VOET. **Biochemistry**. John Wiley and Sons, Inc. New York. 2000.
- VOGELSANGER, N.; FORMOLO, M. C.; PEZZIN, A. P. T.; SCHNEIDER, A. L. S.; FURLAN, S. A.; BERNARDO, H. P.; PEZZIN, S. H.; PIRES, A. T. N.; DUEK, E. A. R. Blendas biodegradáveis de poli(3-hidroxibutirato) e poli(ε-caprolactona): obtenção e estudo da miscibilidade. **Materials Research**, 6, p.359-365, 2003.
- VOGELSANGER, N.; FURLAN S. A.; SCHNEIDER, A. L. S.; PIRES, A. T. N.; PEZZIN, A. P. T.; PEZZIN, S. H. Filmes de P(3HB) e PCL: acompanhamento da biodegradação em solo por propriedades térmicas e morfológicas. **Materia**, 9. n.4. 2004.
- VOLOVA, T.; SHISHATSKAYA, E.; SEVASTIANOV, V.; EFREMOV, S; MOGILNAYA, O. Results of biomedical investigations of PHB and PHV fibers. Article in press. **Biochemical Eng. Journal**. Article in press, 2003.
- VOLOVA, T. G.; KALACHEVA, G. S.; ALTUKHOVA, O. V. Autotrophic synthesis of polyhydroxyalkanoate by the bacteria *Ralstonia eutropha* in the presence of carbon monoxide. **Appl. Microbial. Biotechnol.**, 58, p.675-678, 2002.
- WANG, F.; LEE, S. Y. Poly(3-hydroxybutyrate) production with high polymer content by fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. **Appl. Environ. Microbiol.**, 63, p.3703-3706, 1997.
- WILLIAMS, S. e MARTIN, D. Applications of PHAs in medicine and pharmacy. In: STEINBÜCHEL, A.; DOI, Y. **Biopolymers**. V4. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.
- WOODWARD, S. C. *et al.* The intracellular degradation of poly(ε-caprolactona). **J. Biomed. Mater. Res.**, v.19, p.437-444, 1985.
- YAMANE, T. Cultivation engineering of microbial bioplastics production. **Fems Microbiol. Reviews**, 103, p. 257-264, 1992.
- YAMANE, T.; FUKUNAGA, M.; LEE, Y. W. Increased PHB productivity by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth-associated PHB producer. **Biotechnol. Bioeng.**, 50, p.197-202, 1996.

YAN, Q. et al. Biosyntheses of PHAs with continuous feeding of mixed organic acids as carbon sources by *Ralstonia eutropha*. **Process Biochemistry**, p. 1-5, 2003.

YOSHIE, N. e INOUE, Y. Structure, composition and solution properties of PHAs. In: STEINBÜCHEL, A.; DOI, Y. **Biopolymers**. v.3b. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.

[www.radiobras.gov.br](http://www.radiobras.gov.br). Acessado em 25/03 de 2006.

[www.abiplast.com.br](http://www.abiplast.com.br). Acessado em 25/03 de 2006.

[www.joinville.sc.gov.br](http://www.joinville.sc.gov.br). Acessado em 27/07 de 2005.

[www.metabolix.com](http://www.metabolix.com). Acessado em 25/03 de 2006.

[www.inventabrasilnet15.com.br](http://www.inventabrasilnet15.com.br). Acessado em 27/07 de 2005.

## **ANEXO 1**

### **CURVAS DE CORRELAÇÃO**

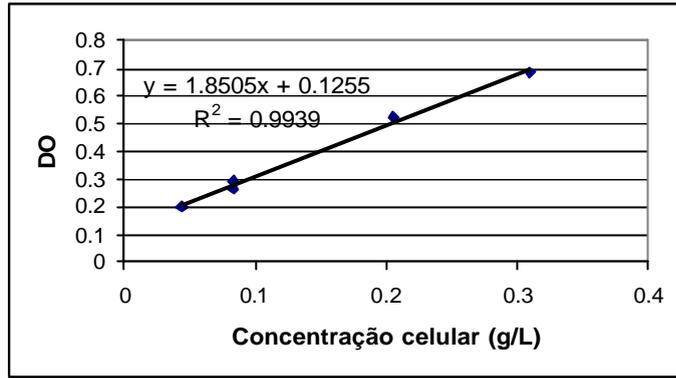


Figura A.1 Curva de correlação abs × peso seco para células de *Ralstonia eutropha*

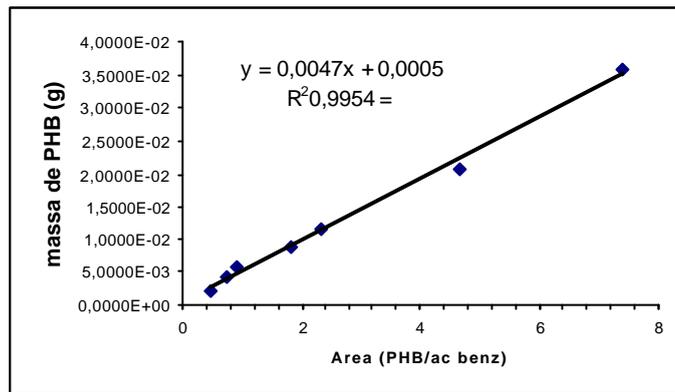


Figura A.2 Curva típica padrão para determinação da concentração de P(3HB)

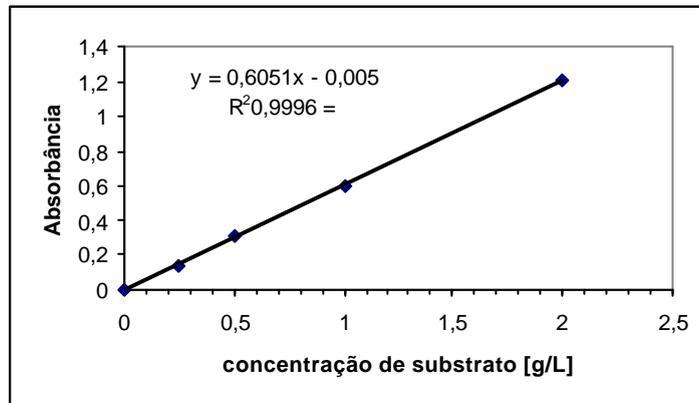


Figura A.3 Curva típica padrão para determinação da concentração de substrato

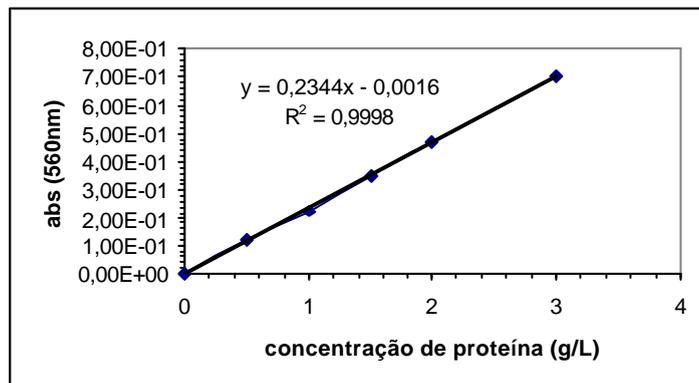
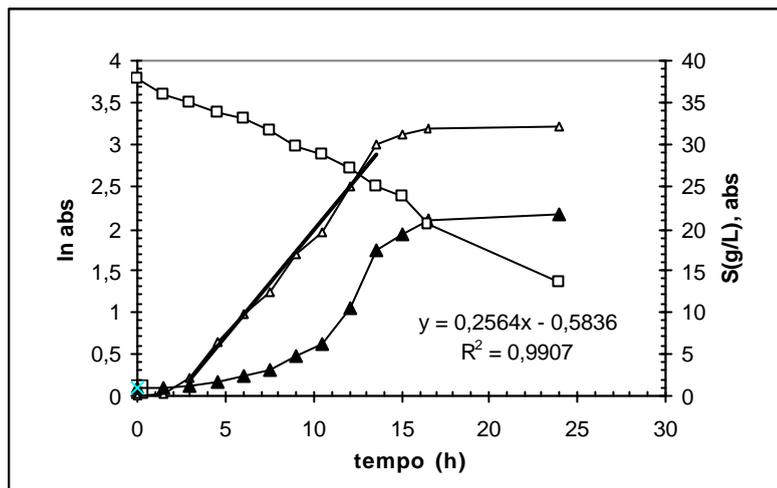


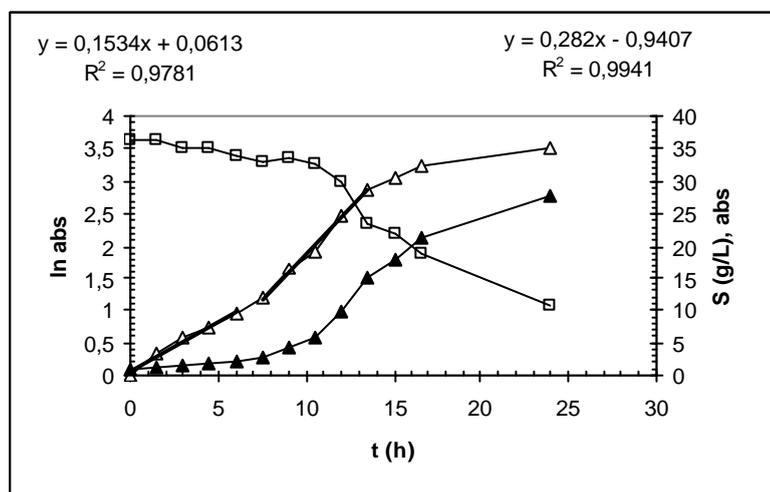
Figura A.4 Curva típica padrão para determinação da concentração de proteína

**ANEXO 2**

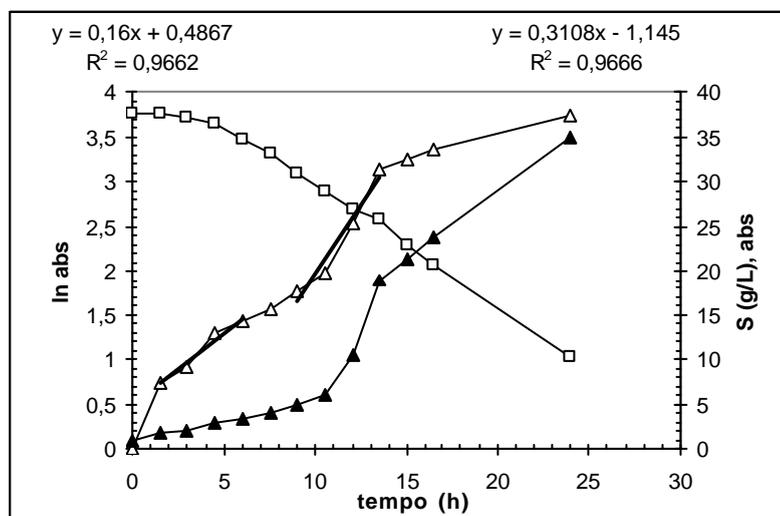
**CULTIVO DE *Ralstonia eutropha* PARA ENSAIOS CONDUZIDOS EM FRASCOS  
AGITADOS COM ADIÇÃO DE ÁCIDO OLÉICO SOBRE O CRESCIMENTO  
CELULAR  
NAS TEMPERATURAS DE 30° E 37°C**



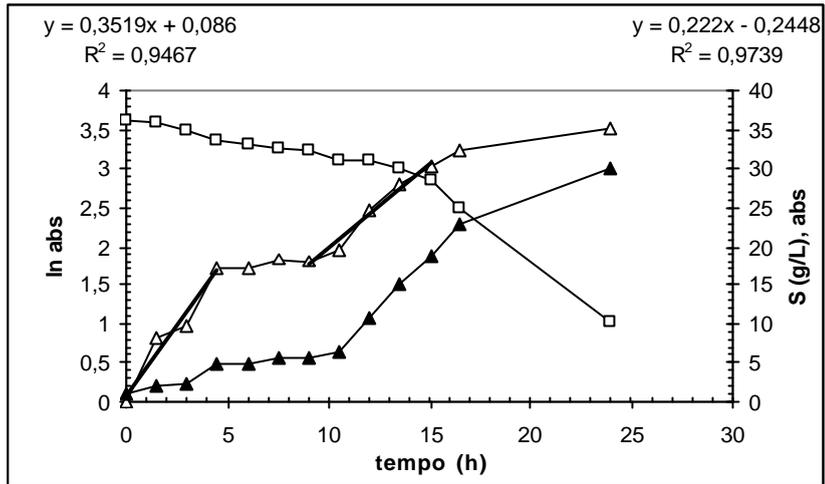
**Figura 2.1.** Crescimento celular (expresso em absorvância) (●), consumo de substrato (■) e ln abs (▲) a 30°C sem adição de ácido oléico



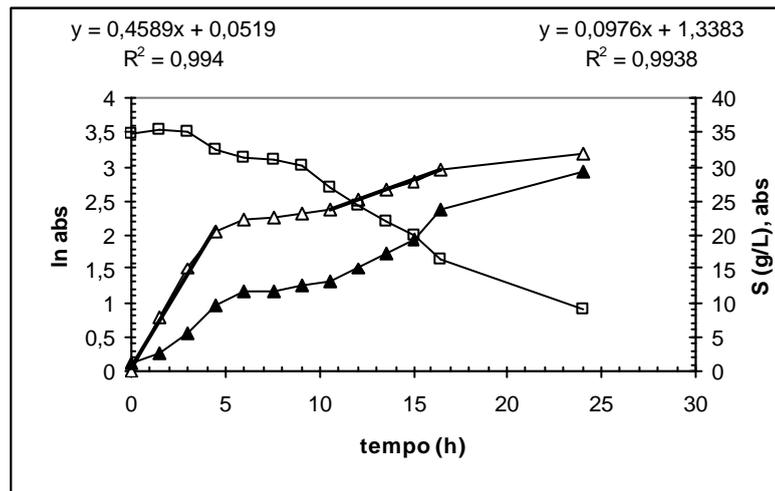
**Figura 2.2.** Crescimento celular (expresso em absorvância) (●), consumo de substrato (■) e ln abs (▲) a 30°C com 0,3g/L de ácido oléico



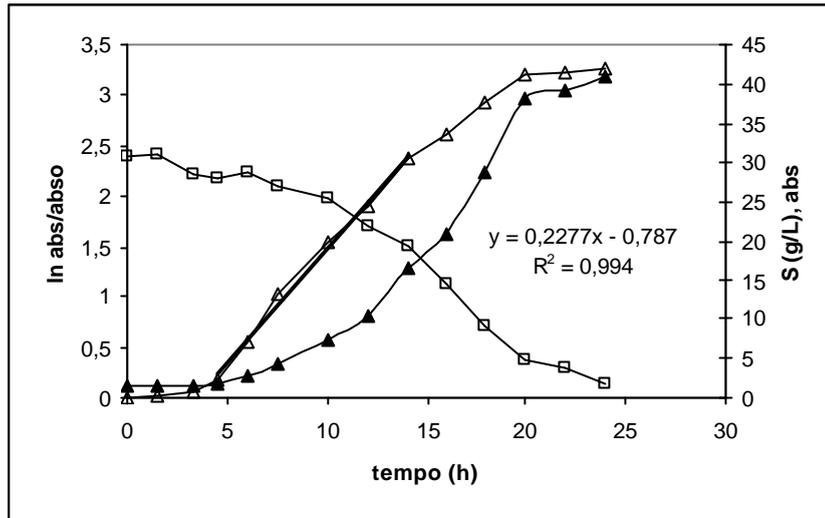
**Figura 2.3.** Crescimento celular (expresso em absorvância) (●), consumo de substrato (■) e ln abs (▲) a 30°C com 0,9g/L de ácido oléico



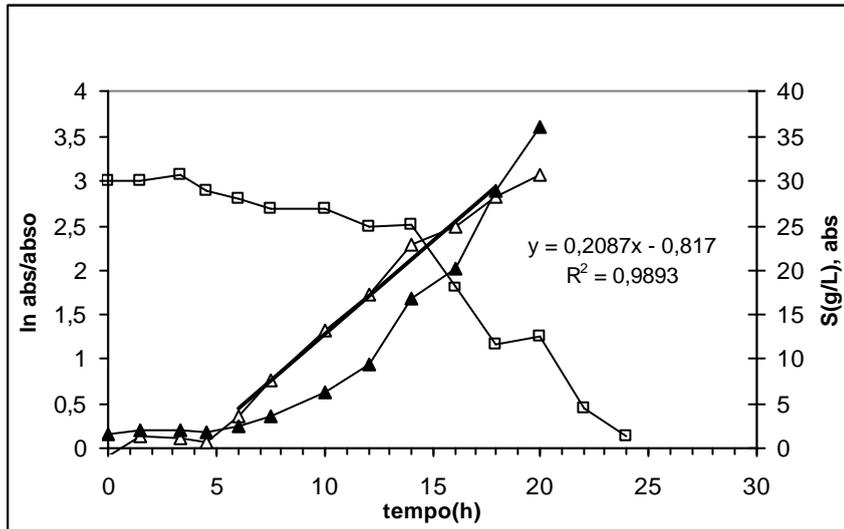
**Figura 2.4.** Crescimento celular (expresso em absorvância) (? ), consumo de substrato (?) e  $\ln \text{abs}$  ( $\Delta$ ) a 30°C com 1,5 g/L de ácido oléico



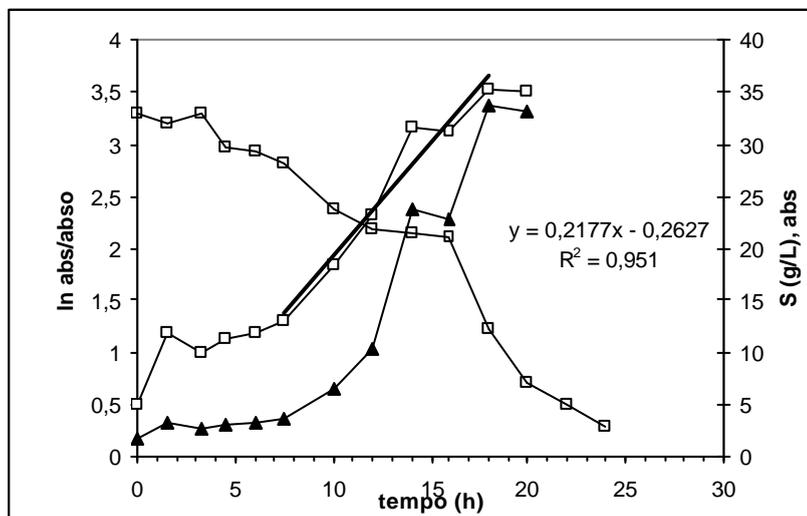
**Figura 2.5.** Crescimento celular (expresso em absorvância) (? ), consumo de substrato (?) e  $\ln \text{abs}$  ( $\Delta$ ) a 30°C com 3,0g/L de ácido oléico



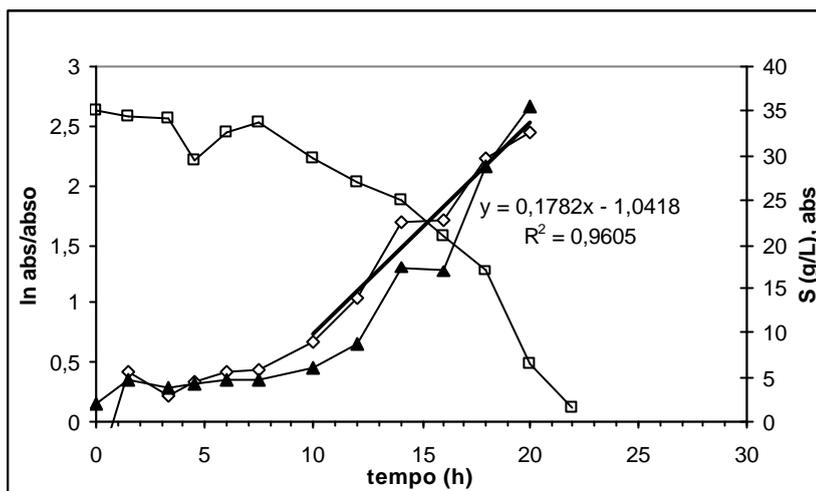
**Figura 2.6.** Crescimento celular (expresso em absorvância) (□), consumo de substrato (▲) e ln abs (Δ) a 37°C sem adição de ácido oléico



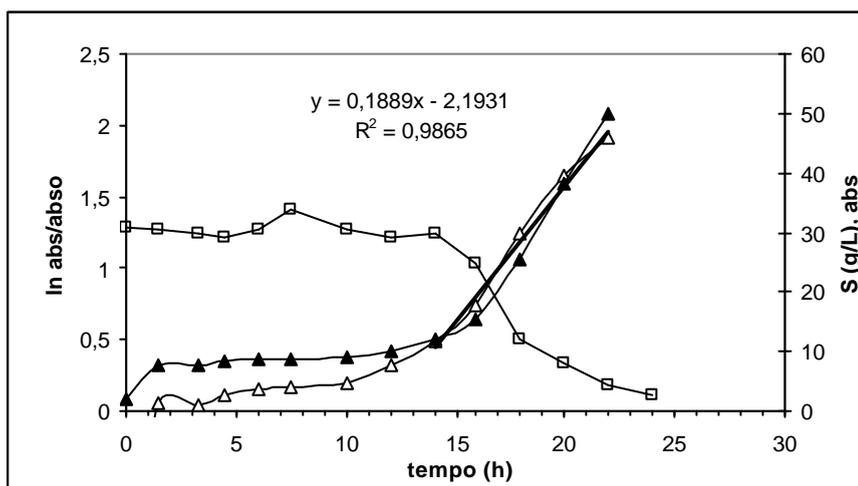
**Figura 2.7.** Crescimento celular (expresso em absorvância) (□), consumo de substrato (▲) e ln abs (Δ) a 37°C com 0,3g/L de ácido oléico



**Figura 2.8.** Crescimento celular (expresso em absorvância) (□), consumo de substrato (▲) e ln abs (Δ) a 37°C com 0,9g/L de ácido oléico



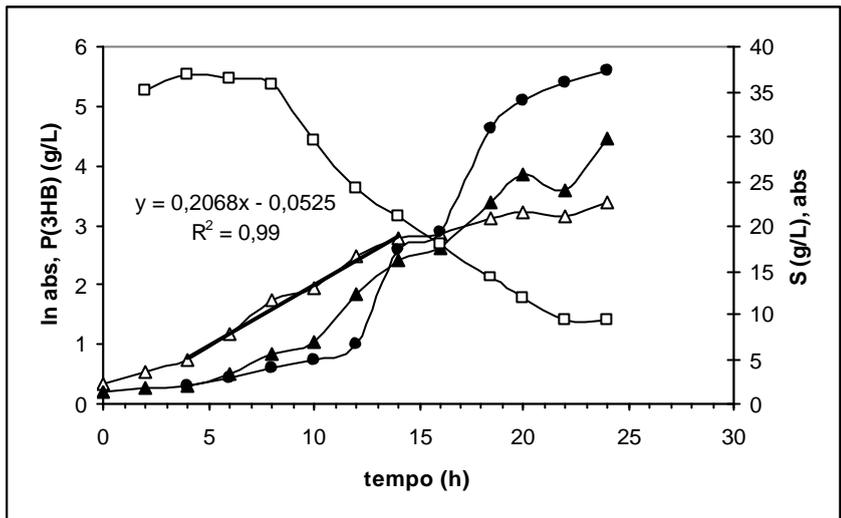
**Figura 2.9.** Crescimento celular (expresso em absorvância) (□), consumo de substrato (▲) e ln abs (Δ) a 37°C com 1,50g/L de ácido oléico



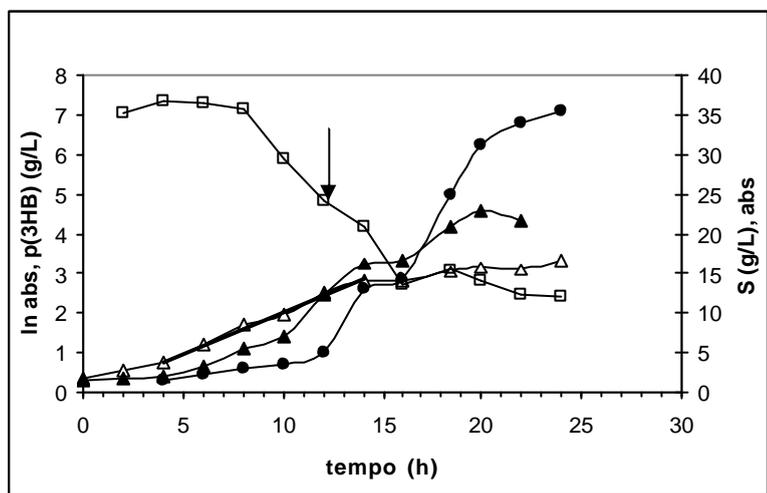
**Figura 2.10.** Crescimento celular (expresso em absorvância) (□), consumo de substrato (▲) e ln abs (Δ) a 37°C com 3,0g/L de ácido oléico

**ANEXO 3**

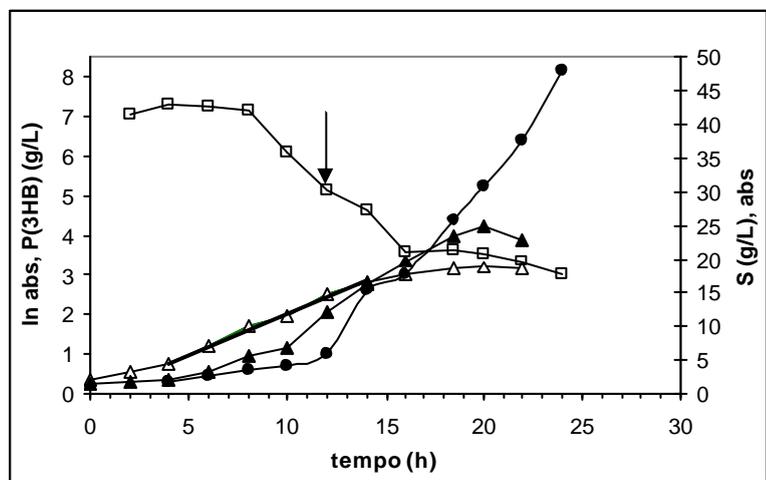
**CULTIVO DE *Ralstonia eutropha* PARA ENSAIOS CONDUZIDOS EM FRASCOS  
AGITADOS COM ADIÇÃO DE ÁCIDO OLÉICO  
SOBRE A FASE DE PRODUÇÃO DO POLÍMERO  
NAS TEMPERATURAS DE 30° E 37°C**



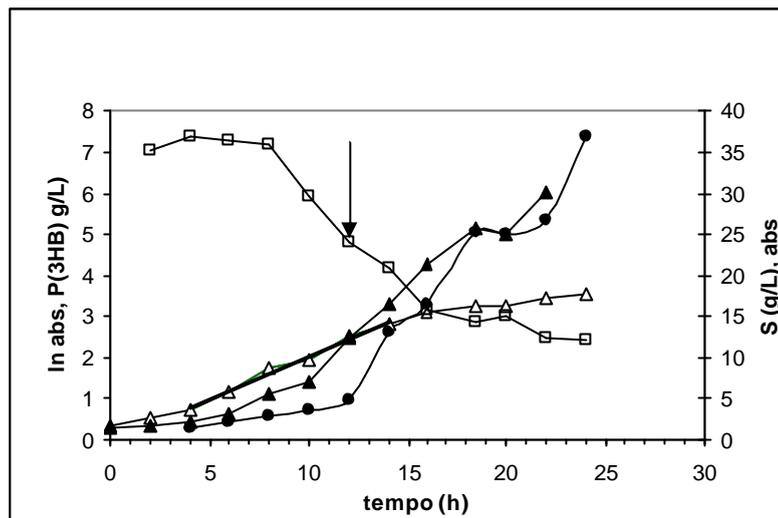
**Figura 3.1.** Crescimento celular (expresso em absorvância) (□), consumo de substrato (□), P(3HB) (●) e ln abs (△) a 30°C sem adição de ácido oléico



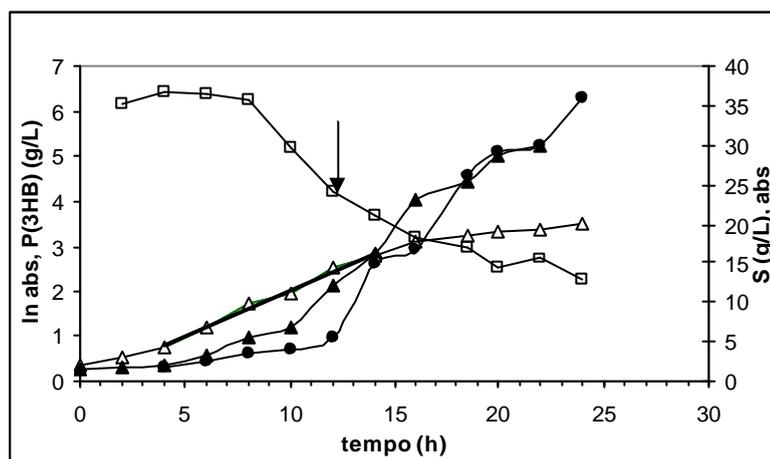
**Figura 3.2.** Crescimento celular (expresso em absorvância) (□), consumo de substrato (□), P(3HB) (●) e ln abs (△) a 30°C com pulso de 0,3g/L de ácido oléico em 14h de cultivo



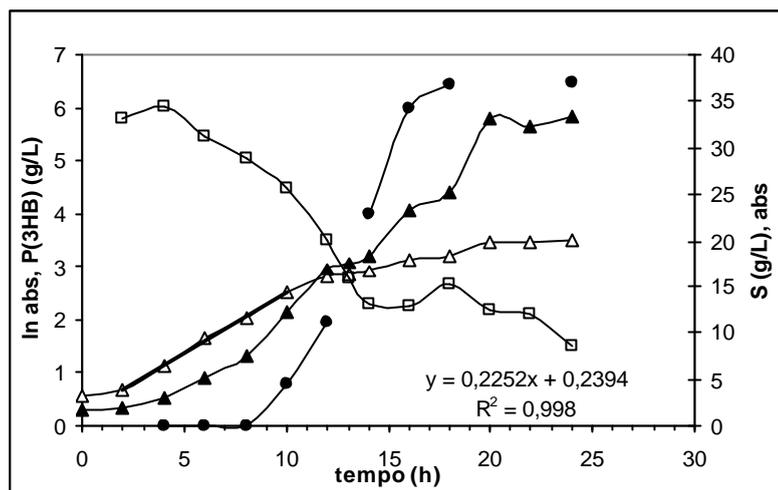
**Figura 3.3.** Crescimento celular (expresso em absorvância) (□), consumo de substrato (□), P(3HB) (●) e ln abs (△) a 30°C com pulso de 0,9g/L de ácido oléico em 14h de cultivo



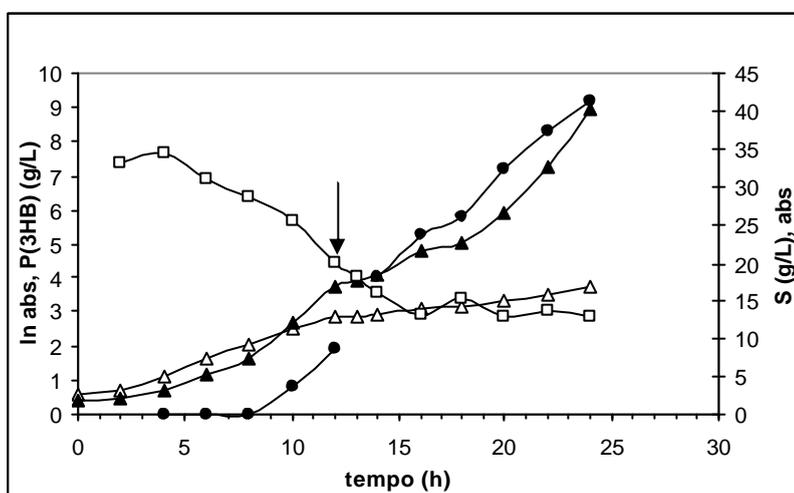
**Figura 3.4.** Crescimento celular (expresso em absorvância) (▲), consumo de substrato (□), P(3HB) (●) e In abs (△) a 30°C com pulso de 1,5g/L de ácido oléico em 14h de cultivo



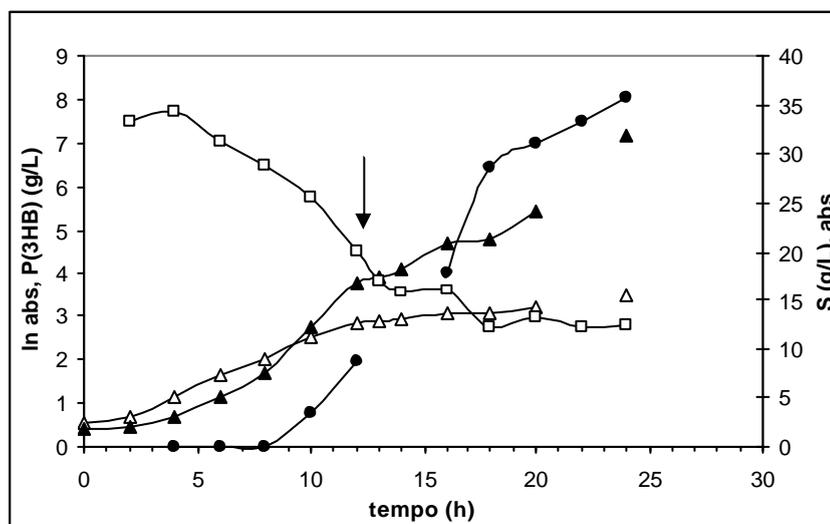
**Figura 3.5.** Crescimento celular (expresso em absorvância) (▲), consumo de substrato (□), P(3HB) (●) e In abs (△) a 30°C com pulso de 3,0g/L de ácido oléico em 14h de cultivo



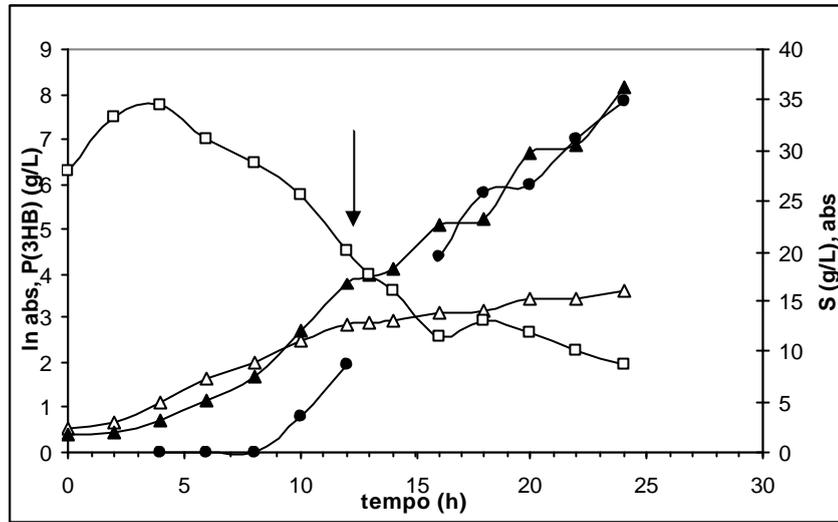
**Figura 3.6.** Crescimento celular (expresso em absorvância) (●), consumo de substrato (□) e ln abs (Δ) a 37°C sem adição de ácido oléico



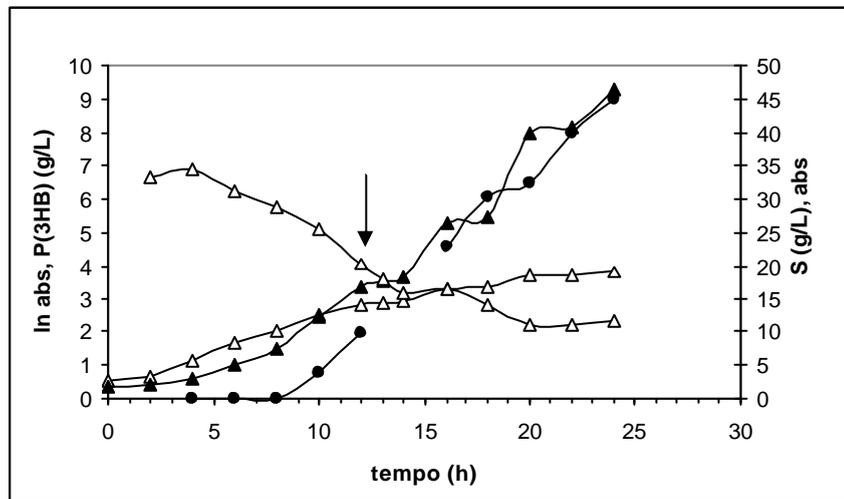
**Figura 3.7.** Crescimento celular (expresso em absorvância) (●), consumo de substrato (□) e ln abs (Δ) a 37°C com pulso de 0,3g/L de ácido oléico em 14h de cultivo



**Figura 3.8.** Crescimento celular (expresso em absorvância) (●), consumo de substrato (□) e ln abs (Δ) a 37°C com pulso de 0,9g/L de ácido oléico em 14h de cultivo



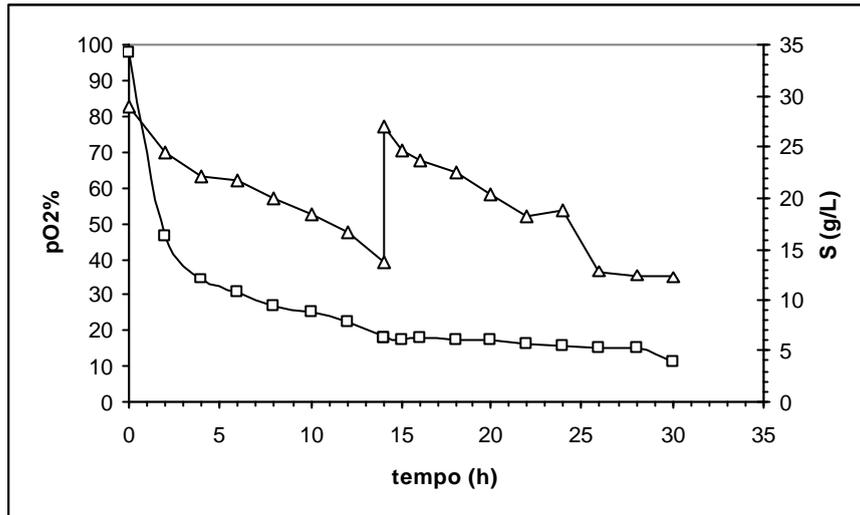
**Figura 3.9.** Crescimento celular (expresso em absorvância) (? ), consumo de substrato(?) e ln abs ( $\Delta$ ) a 37°C com pulso de 1,5g/L de ácido oléico em 14h de cultivo



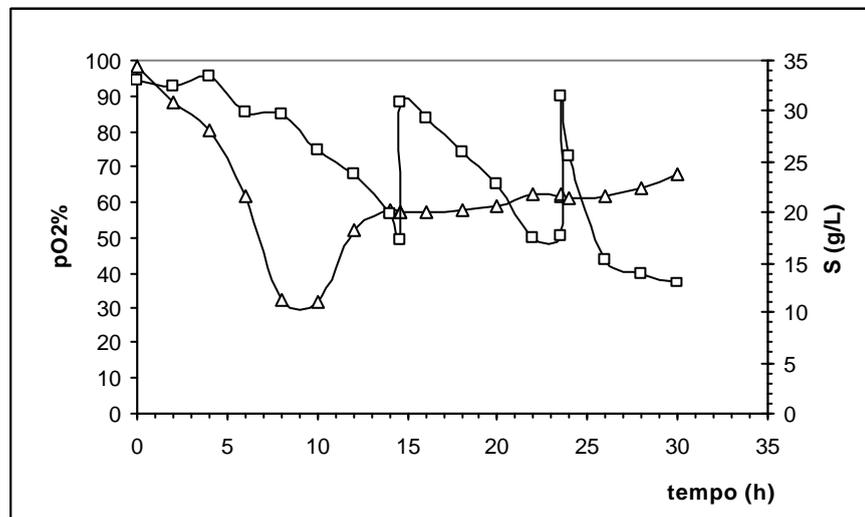
**Figura 3.10.** Crescimento celular (expresso em absorvância) (? ), consumo de substrato(?) e ln abs ( $\Delta$ ) a 37°C com pulso de 3,0g/L de ácido oléico em 14h de cultivo

## **ANEXO 4**

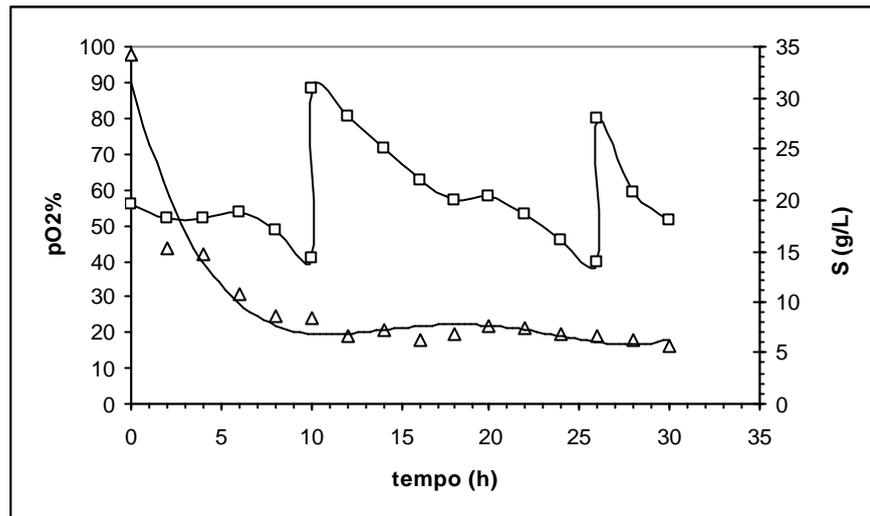
**CULTIVO DE *Ralstonia eutropha* PARA ENSAIOS CONDUZIDOS EM  
BIORREATOR EM DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE ADIÇÃO DE ÁCIDO  
OLÉICO E TEMPERATURA DE PROCESSO**



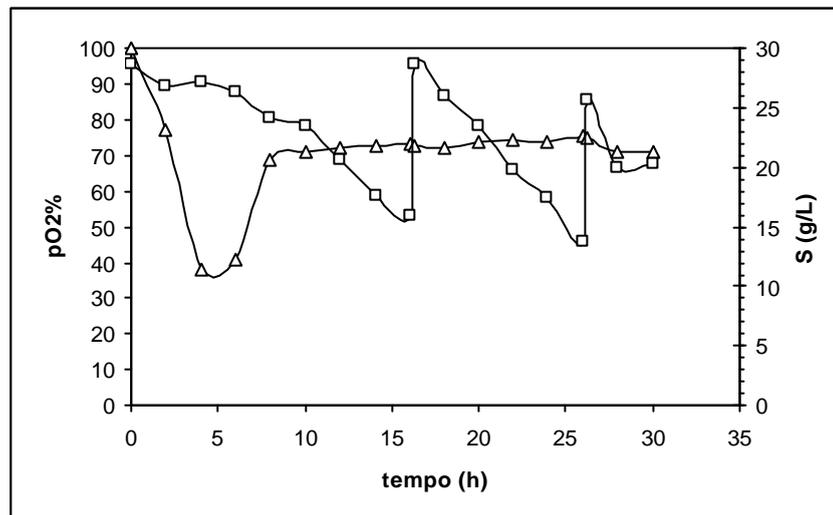
**Figura 4.1BT1.** Evolução da pressão parcial de oxigênio e consumo de substrato em ensaios conduzidos sem adição de ácido oléico e temperatura constante de 30°C



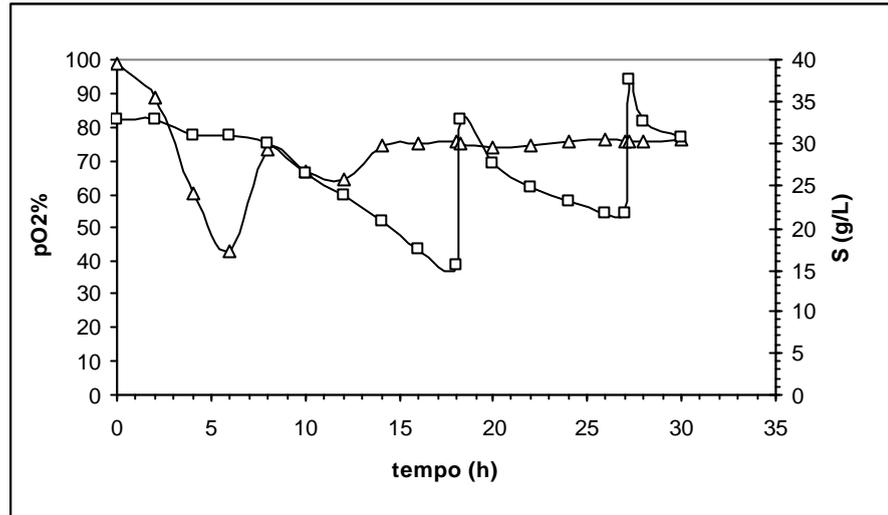
**Figura 4.2 BT2.** Evolução da pressão parcial de oxigênio e consumo de substrato em ensaios conduzidos sem adição de ácido oléico e temperatura constante de 37°C



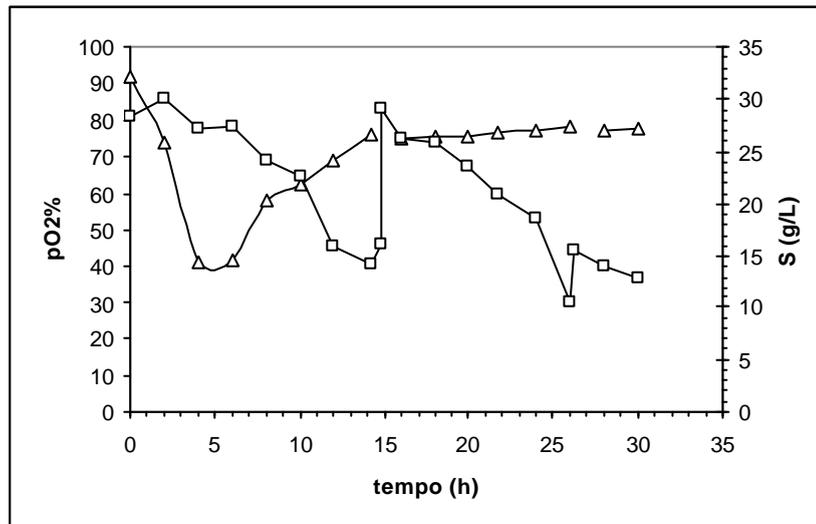
**Figura 4.3 BT3.** Evolução da pressão parcial de oxigênio e consumo de substrato em ensaios conduzidos a 30°C até a fase de carência em nitrogênio e 37°C na fase de produção do polímero



**Figura 4.4 BT4.** Evolução da pressão parcial de oxigênio e consumo de substrato em ensaios conduzidos com adição de 3,0g/L de ácido oléico e 30°C até a fase de carência em nitrogênio e 37°C na fase de produção do polímero



**Figura 4.5 BT5.** Evolução da pressão parcial de oxigênio e consumo de substrato em ensaios conduzidos com adição de 3,0g/L de ácido oléico e 30°C até a fase de carência em nitrogênio e adição de 3,0g/L de ácido oléico e 37°C na fase de produção do polímero



**Figura 4.6. BT6.** Evolução da pressão parcial de oxigênio e consumo de substrato em ensaios conduzidos com adição de óleo de canola (equivalente a 3,0g/L em ácido oléico) e 30°C até a fase de carência em nitrogênio e adição de óleo de canola (equivalente a 3,0g/L em ácido oléico) e 37°C na fase de produção do polímero

**Tabela A41.** Tempo de duração, substrato (açúcar invertido) consumido, biomassa residual, biomassa total, P(3HB) e velocidade específica máxima de crescimento correspondente à fase de crescimento (identificado pela presença de nitrogênio)

Fase de crescimento					
Estratégia	t <sub>cresc</sub> (h)	S <sub>cons</sub> (g/L)	X <sub>r final</sub> cresc (g/L)	X <sub>t final</sub> cresc (g/L)	P(3HB) final cresc (g/L)
BT1	12,0	12,0	4,0	5,0	1,0
BT2	14,0	13,0	6,0	8,0	2,0
BT3	14,0	13,0	4,0	5,0	1,0
BT4	8,0	4,5	4,0	5,0	1,0
BT5	8,0	3,0	4,0	6,0	2,0
BT6	8,0	6,0	6,0	8,0	2,0

**Tabela A42.** Concentração de substrato (açúcar invertido) consumido, biomassa residual, biomassa total e P(3HB) correspondente à fase de produção (identificado pela exaustão de nitrogênio)

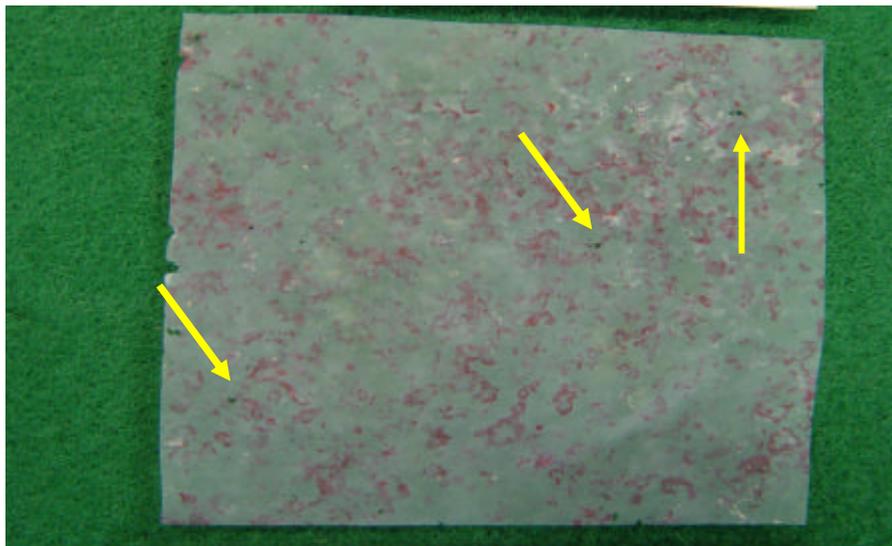
Estratégia	Fase de produção*			
	S <sub>cons</sub> (g/L)	X <sub>r final</sub> prod (g/L)	X <sub>t final</sub> prod (g/L)	P(3HB) final prod (g/L)
BT1	20,0	6,0	12,0	6,0
BT2	34,0	11,5	19,0	7,5
BT3	21,0	5,5	11,5	6,0
BT4	20,0	9,0	15,0	6,0
BT5	25,0	6,0	16,0	10,0
BT6	20,0	7,6	18,6	11,0

\* a fase de produção foi definida em 16 h para todos os ensaios.

**ANEXO 5**

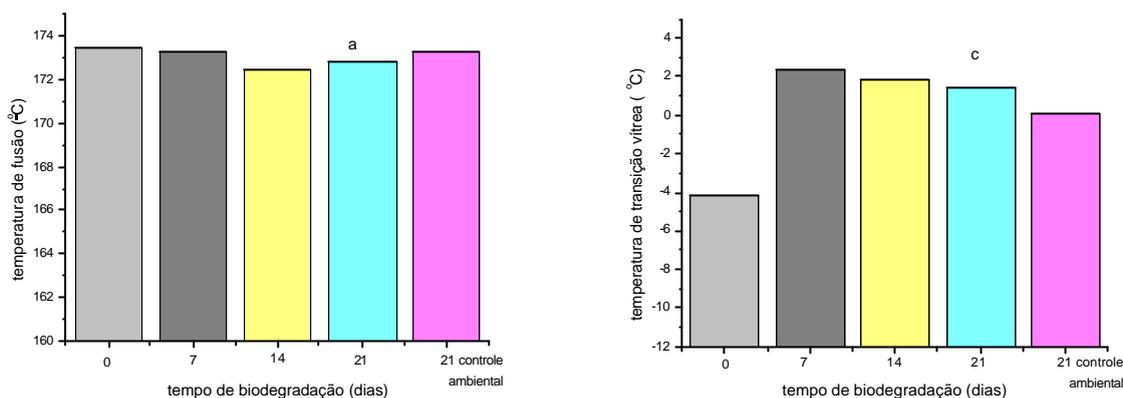


(a)



(b)

**Figura A5.1.** Filme de P(3HB) sintetizada sem a presença do ácido graxo (controle) (a) sem degradação e (b) após 21 dias de degradação com a formação de colônias na superfície do filme e a presença de regiões já degradadas (orifícios)



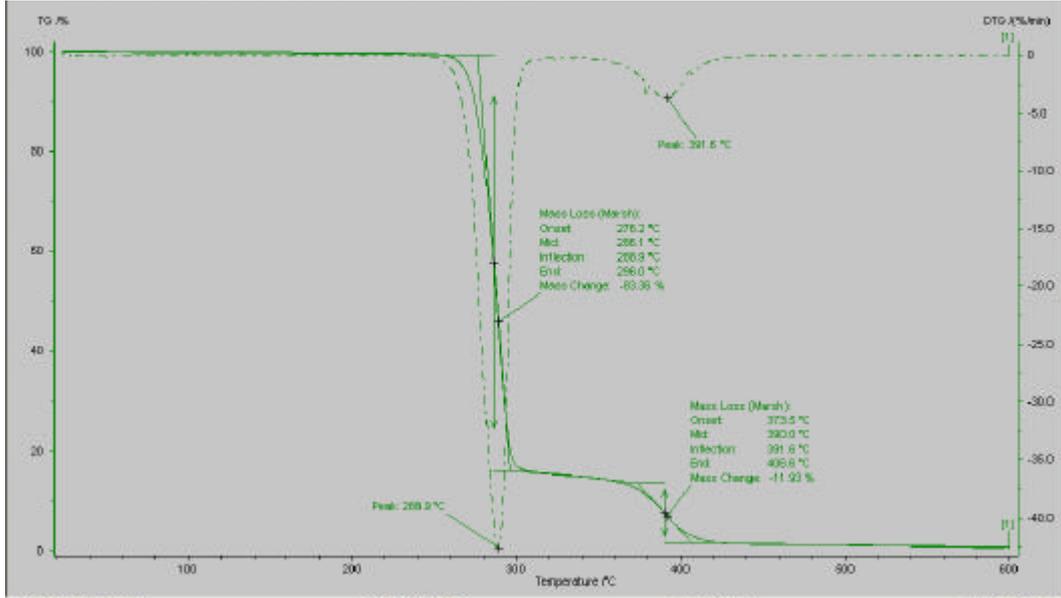
**Figura A5.2** Influência do tempo de biodegradação nas propriedades térmicas do P(3HB) sem adição de ácido oléico (controle) a) temperatura de fusão e b) temperatura de transição vítrea

**Tabela A5.1.** Valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ), entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), obtidos por DSC (segundo aquecimento) das amostras de P(3HB) após 7 dias de degradação em função da concentração de ácido oléico mostrando a  $T_g$  (\*)

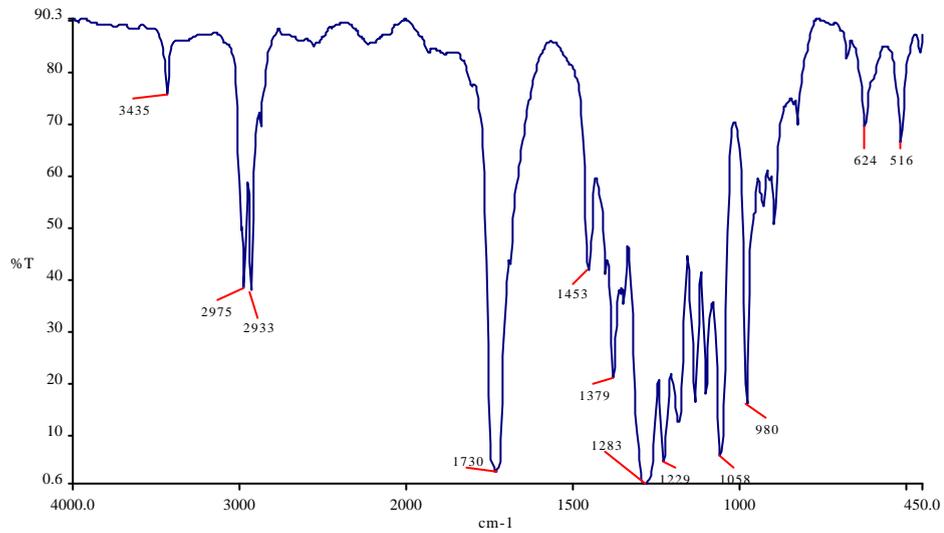
Concentração de ácido oléico	$T_g$ (°C)	$T_c$ (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)	$\%c$ (%)
0g/L	2	49	22	173	81	42
0,3g/L	3			172	94	66
0,9g/L	1	----	----	173	86	61
1,5g/L	-5	-----	-----	172	88	62
3,0g/L	-8	-----	-----	163 172	40	28

**Tabela A5.2.** Valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalização ( $T_c$ ), entalpia de cristalização ( $\Delta H_c$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), obtidos por DSC (segundo aquecimento) das amostras de P(3HB) após 14 dias de degradação em função da concentração de ácido oléico mostrando a  $T_g$  (\*)

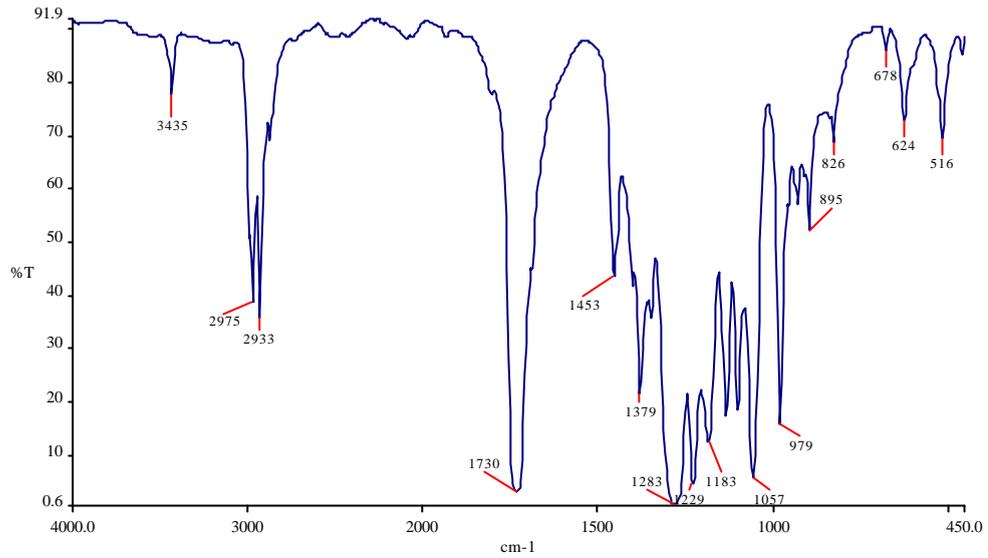
Concentração de ácido oléico	$T_g$ (°C)	$T_c$ (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)	$\%c$ (%)
0g/L	2	49	18	172	78	42
0,3g/L	3			174	93	65
0,9g/L	-1	-----	----	121 135 166 172	38	27



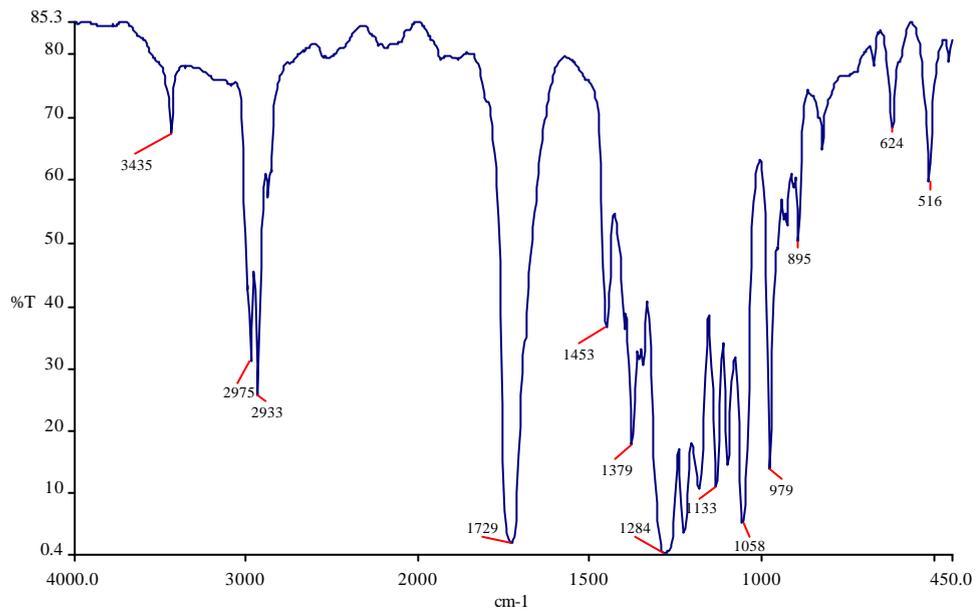
**Figura A5.3.** Termograma apresentando os dados obtidos para o percentual de perda de massa no primeiro e segundo estágio de degradação, as temperaturas do início da degradação térmica e a temperatura máxima de degradação para cada estágio. A curva pontilhada representa a derivada (dm/dT)



**Figura A5.4.** Espectro de FT-IR para o polímero sintetizado por *Ralstonia eutropha* contendo 0,3g/L de ácido oléico no meio de cultura



**Figura A5.5.** Espectro de FT-IR para o polímero sintetizado por *Ralstonia eutropha* contendo 0,9g/L de ácido oléico no meio de cultura



**Figura A5.6.** Espectro de FT-IR para o polímero sintetizado por *Ralstonia eutropha* contendo 1,5g/L de ácido oléico no meio de cultura

**ANEXO 6**  
**TABELAS REFERENTES AOS DADOS**  
**OBTIDOS DOS TERMOGRAMAS DE DSC E TGA**

### Tabelas referentes às análises DSC

**Tabela A.6.1.** Dados de  $T_g$  e  $T_m$  para as blendas P(3HB)/PCL no 2<sup>o</sup> aquecimento após 7 dias de biodegradação

Blendas	$T_g$ PCL (°C)	$T_m$ PCL (°C)	$T_g$ P(3HB) (°C)	$T_g$ P(3HB) (°C)
PCL	-64	56	--	--
P(3HB)/PCL 20/80	-61	54		141
P(3HB)/PCL 50/50		56		171
P(3HB)/PCL 80/20		54 74		172
P(3HB)	--	--	-10	119 148

**Tabela A.6.2.** Dados de  $T_g$  e  $T_m$  para as blendas P(3HB)/PCL no 2<sup>o</sup> aquecimento após 14 dias de biodegradação

Blendas	$T_g$ PCL (°C)	$T_m$ PCL (°C)	$T_g$ P(3HB) (°C)	$T_g$ P(3HB) (°C)
PCL	-66	56	--	--
P(3HB)/PCL 20/80				
P(3HB)/PCL 50/50				
P(3HB)/PCL 80/20				
P(3HB)	--	--		

**Tabela A.6.3.** Dados de  $T_g$  e  $T_m$  para as blendas P(3HB)/PCL no 2<sup>o</sup> aquecimento após 21 dias de biodegradação

Blendas	$T_g$ PCL (°C)	$T_m$ PCL (°C)	$T_g$ P(3HB) (°C)	$T_g$ P(3HB) (°C)
PCL	-66	56	--	--
P(3HB)/PCL 20/80				
P(3HB)	--	--		

**Tabela A.6.4.** Dados de  $T_m$  e  $\Delta H_m$  para as blendas P(3HB)/PCL no 2<sup>o</sup> aquecimento após 34 dias de biodegradação

Blendas	$T_g$ PCL (°C)	$T_m$ PCL (°C)	$T_g$ P(3HB) (°C)	$T_g$ P(3HB) (°C)
PCL	-66	56	--	--
P(3HB)/PCL 20/80	-63	56		151

### Tabelas referentes às análises TGA

**Tabela A.6.5.** Dados de TGA para os homopolímeros e as blendas P(3HB)/PCL no tempo zero (sem biodegradação). Valores de temperatura inicial de perda de massa ( $T_{onset}$ ) e temperatura máxima de perda de massa ( $T_{peak}$ ) para o P(3HB) e PCL, % perda de massa do P(3HB) e PCL

Blendas	$T_{onset}$ P(3HB) °C	$T_{onset}$ PCL °C	$T_{peak}$ P(3HB) °C	$T_{peak}$ PCL °C	% perda massa P(3HB)	% perda massa PCL
PCL	----	391	----	415	----	98
P(3HB)/PCL 20/80	266	390	281	414	19	75
P(3HB)/PCL 50/50	270	389	285	414	50	46
P(3HB)/PCL 80/20	257	378	271	405	79	21
P(3HB)	265	----	279	----	100	----

**Tabela A.6.6.** Dados de TGA para os homopolímeros e as blendas P(3HB)/PCL após 7 dias de biodegradação. Valores de temperatura inicial de perda de massa ( $T_{onset}$ ) e temperatura máxima de perda de massa ( $T_{peak}$ ) para o P(3HB) e PCL, % perda de massa do P(3HB) e PCL

Blendas	$T_{onset}$ P(3HB) °C	$T_{onset}$ PCL °C	$T_{peak}$ P(3HB) °C	$T_{peak}$ PCL °C	% perda massa P(3HB)	% perda massa PCL
PCL	----	380	----	408	----	98
P(3HB)/PCL 20/80						
P(3HB)/PCL 50/50	261	386	274	408	42	51
P(3HB)/PCL 80/20	258	383	276	405	74	23
P(3HB)	258	----	274	----	100	----

**Tabela A.6.7.** Dados de TGA para os homopolímeros e as blendas P(3HB)/PCL após 14 dias de biodegradação. Valores de temperatura inicial de perda de massa ( $T_{\text{onset}}$ ) e temperatura máxima de perda de massa ( $T_{\text{peak}}$ ) para o P(3HB) e PCL, % perda de massa do P(3HB) e PCL

Blendas	$T_{\text{onset}}$ P(3HB) °C	$T_{\text{onset}}$ PCL °C	$T_{\text{peak}}$ P(3HB) °C	$T_{\text{peak}}$ PCL °C	% perda massa P(3HB)	% perda massa PCL
PCL	----	383	----	410	----	98
P(3HB)/PCL 20/80	255	384	265	410	11	82
P(3HB)/PCL 50/50	267	385	288	412	30	63
P(3HB)/PCL 80/20	244	374	260	396	72	16
P(3HB)	251	----	263	----	96	----

**Tabela A.6.8.** Dados de TGA para os homopolímeros e as blendas P(3HB)/PCL após 21 dias de biodegradação. Valores de temperatura inicial de perda de massa ( $T_{\text{onset}}$ ) e temperatura máxima de perda de massa ( $T_{\text{peak}}$ ) para o P(3HB) e PCL, % perda de massa do P(3HB) e PCL

Blendas	$T_{\text{onset}}$ P(3HB) °C	$T_{\text{onset}}$ PCL °C	$T_{\text{peak}}$ P(3HB) °C	$T_{\text{peak}}$ PCL °C	% perda massa P(3HB)	% perda massa PCL
PCL	----	382	----	412	----	99
P(3HB)/PCL 20/80	260	385	274	409	11	83
P(3HB)		----		----		----

**Tabela A.6.9.** Dados de TGA para os homopolímeros e as blendas P(3HB)/PCL após 34 dias de biodegradação. Valores de temperatura inicial de perda de massa ( $T_{\text{onset}}$ ) e temperatura máxima de perda de massa ( $T_{\text{peak}}$ ) para o P(3HB) e PCL, % perda de massa do P(3HB) e PCL

Blendas	$T_{\text{onset}}$ P(3HB) °C	$T_{\text{onset}}$ PCL °C	$T_{\text{peak}}$ P(3HB) °C	$T_{\text{peak}}$ PCL °C	% perda massa P(3HB)	% perda massa PCL
PCL	----	383	----	412	----	99
P(3HB)/PCL 20/80						

**Tabela A.6.10.** Dados de TGA para os homopolímeros e as blendas P(3HB)/PCL após 62 dias de biodegradação. Valores de temperatura inicial de perda de massa ( $T_{\text{onset}}$ ), temperatura máxima de perda de massa ( $T_{\text{peak}}$ ) para o P(3HB) e PCL, % perda de massa do P(3HB) e PCL

<b>Blendas</b>	<b><math>T_{\text{onset}}</math> P(3HB) °C</b>	<b><math>T_{\text{onset}}</math> PCL °C</b>	<b><math>T_{\text{peak}}</math> P(3HB) °C</b>	<b><math>T_{\text{peak}}</math> PCL °C</b>	<b>% perda massa P(3HB)</b>	<b>% perda massa PCL</b>
<b>PCL</b>	----	382	----	412	----	96
<b>P(3HB)/PCL 20/80</b>	244	386	261	411	0	86

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)