

Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo

Gisele Bohn Machado

**Otimização do processo de recuperação do biopolímero PHB com
surfactante vegetal por planejamento de experimentos**

São Paulo

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Gisele Bohn Machado

**Otimização do processo de recuperação do
biopolímero PHB com surfactante vegetal por
planejamento de experimentos**

Gisele Bohn Machado

Otimização do processo de recuperação do biopolímero PHB com surfactante vegetal por planejamento de experimentos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo - IPT, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Processos Industriais.

Data da aprovação: 10/09/2008

Prof Dr José Geraldo da Cruz Pradella (Orientador)

Dra Mickie Takagi (Co-orientadora)

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Dr José Geraldo da Cruz Pradella (Orientador)
Instituto do Butantã

Dra Mickie Takagi (Co-orientadora)
Instituto do Butantã

Prof. Dr Marcelo Martins Seckler (Membro)
IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo

Dr. Joaquim Cabrera-Crespo (Membro)
Instituto do Butantã

Gisele Bohn Machado

Otimização do processo de recuperação do biopolímero PHB com
surfactante vegetal por planejamento de experimentos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de
Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo - IPT,
como parte dos requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Processos Industriais.
Área de Concentração: Desenvolvimento e Otimização de
Processos Industriais

Orientador: Prof Dr José Geraldo da Cruz Pradella
Co-orientadora: Dra Mickie Takagi

São Paulo
Setembro/2008

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Departamento de Acervo e Informação Tecnológica – DAIT
do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo - IPT

M149o Machado, Gisele Bohn
Otimização do processo de recuperação do biopolímero PHB com surfactante
vegetal por planejamento de experimentos. / Gisele Bohn Machado. São Paulo, 2008.
79p.

Dissertação (Mestrado em Processos Industriais) - Instituto de Pesquisas
Tecnológicas do Estado de São Paulo. Área de concentração: Desenvolvimento e Otimização
de Processos Industriais.

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo da Cruz Pradella.
Co-orientadora: Dra. Mickie Takagi

1. Biopolímero PHB 2. Polihidroxialcanoato 3. Surfactante vegetal 4. Tese I.
Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo. Coordenadoria de
Ensino Tecnológico II. Título

08-225

CDU 541.6(043)

*Aos meus queridos pais Lourdes e Irineu, e
irmão Leandro, família que jamais teria o dom de
escolher tão perfeita.*

*Ao Cleber, que a cada dia renova minha
certeza de querer seguir ao seu lado o caminho
rumo a toda a vida.*

*“A mente que se abre para uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo o que ele deixa acontecer em minha vida.

Aos meus orientadores Dr. José Geraldo da Cruz Pradella e Dra Mickie Takagi pela oportunidade da realização deste trabalho, paciência, colaboração e valiosa amizade, mesmo a distância.

Aos meus companheiros do Laboratório de Fermentação do Instituto do Butantã, e em especial ao Mateus Ribeiro por ter me ajudado tanto nos ensaios.

Aos meus amigos do Agrupamento de Biotecnologia da IPT, Rafael C. Santos Rocha e Fernanda da Silva pelas longas conversas no almoço e valiosa colaboração nas análises e nos caminhos no IPT.

Ao Valter, conhecido como “Valtinho” do Agrupamento de Biotecnologia do IPT que se não fosse por ele minhas análises no IPT seriam muito mais tortuosas.

Aos meus colegas e amigos da DuPont, em especial Ricardo Abrahão e Samanta Barbosa pela motivação, força e valiosos conselhos.

Ao Instituto do Butantã e ao IPT, pelo espaço físico e material cedidos para a realização deste trabalho.

A DuPont por ter cedido o meu tempo para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

RESUMO

A busca por uma alternativa aos plásticos de origem petroquímica cujo acúmulo vem causando dano ao meio ambiente tem aumentado o interesse pelo polihidroxicanoatos (PHA), polímeros biodegradáveis bacterianos, dentre os quais o mais conhecido é o PHB. O estudo da etapa de recuperação desses polímeros é vital para que se atinja elevada pureza e elevada massa molecular com baixo custo de produção requerida para algumas aplicações. Dentre os métodos adotados para este propósito o uso de surfactante vegetal se mostra inicialmente vantajoso por possuir baixa toxicidade, baixo custo e fácil manipulação quando comparado aos métodos comumente empregados. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar e otimizar a rota de recuperação do polímero poli(3 -hidroxibutirato) (PHB) com o uso de surfactante de origem vegetal por planejamento de experimentos por superfície de resposta. Os principais fatores que influenciam a pureza e a massa molecular do PHB extraído foram investigados. As propriedades de teor de PHB (pureza) e massa molecular foram otimizadas com base na concentração de surfactante, na razão de EDTA por biomassa seca, no valor de pH, temperatura e tempo de tratamento. A análise estatística da condição otimizada indicou que o processo em pH = 13, temperatura a 50°C, concentração de surfactante a 0,3 g/g biomassa, EDTA a 0,004 g/g biomassa e tempo de tratamento de 700 s, com agitação contínua pode-se obter um polímero com pureza de 96,48 % e massa molecular de 302062 Da. Além do avanço obtido rumo à busca de um processo tecnológica e economicamente vantajoso, o presente trabalho representa importante orientação metodológica para a continuidade do desenvolvimento da rota industrial com surfactante vegetal visando à recuperação de biopolímeros bacterianos.

Palavras-chave: Polihidroxicanoato, PHB, Extração, Purificação, Recuperação, Planejamento de experimentos

ABSTRACT

Optimization of the recovery of biopolymer PHB employing surfactant through design of experiments

The search of alternatives for petrochemical plastics, responsible for several damages to the environment has increased the interest in polyhydroxyalkanoates (PHA), bacterial biodegradable polymers, among which the most known is the polyhydroxybutyrate. The study of the recovery of the PHB production is particularly important and should lead to a high purity and high molecular weight at a low production cost required by different applications. Among the methods used to lyse the cells, the surfactant rupture is considered advantageous due to its low toxicity, low cost and easy-handling compared to most common extraction methods. Based on this, the aim of this work was the evaluation and optimization of the recovery step of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) employing surfactant through design of experiments using response surface. The key factors that influence the purity and molecular weight were investigated. The purity and molecular weight were optimized by the amount of surfactant, the ratio of EDTA to dry biomass, pH value, temperature and treatment time. The statistical analysis of optimal recovery condition showed that at pH = 13, temperature at 50°C, 0,3 g surfactant/ g biomass ratio, 0,004 g EDTA/g biomass ratio and 700s as treatment time, under continuous agitation, one can obtain a polymer with a purity of 96,48% and molecular weight of 302062 Da. Despite the progress towards the development of an economic and technological viable process, this work represents a methodological contribution to the improvement of the industrial route using surfactant for the recovery of bacterial biopolymers.

Keywords: Polyhydroxyalkanoate, PHB, Extraction, Purification, Recovery, Design of Experiments

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura geral dos PHAs (polihidroxialcanoatos). PHAs são poliésteres com (R)-3-hidroxi ácidos como unidades monoméricas.....	15
Figura 2: Cisão de triglicerídeos provenientes de óleos vegetais.....	22
Figura 3: Via catabólica do glicerol.....	22
Figura 4: Via metabólica de formação de Acetil-CoA a partir de ácidos graxos. (modificada a partir de PARK <i>et al.</i> , http://mbel.kaist.ac.kr/research/phako.html)	23
Figura 5: Diferentes destinos da Acetil-CoA proveniente do catabolismo do glicerol e dos ácidos graxos.	25
Figura 6: Fórmula geral da Cocamidopropil betaína.	27
Figura 7: Estratégia de recuperação de PHAs, composta por três processos: pré-tratamento, extração e purificação.	29
Figura 8: Esquema de um planejamento composto central para 2 fatores. Os pontos no diagrama representam as corridas a serem realizadas.....	38
Figura 9: Esquema do planejamento Box-Behnken para 3 fatores. Os pontos no diagrama representam as corridas a serem realizadas.....	39
Figura 10: Planilha de ensaios que será utilizada neste estudo. A coluna C1 indica a ordem padrão dos ensaios; a coluna C2 indica a ordem em que os ensaios deverão ser conduzidos para garantir a randomização; a coluna C3 e C4 são parâmetros que serão usados no tratamento estatístico dos dados; e nas colunas C8, C9 e C10 serão adicionados os resultados obtidos de cada ensaio para efetuar a análise estatística.	45
Figura 11: Esquema em fluxograma dos ensaios de recuperação.....	46
Figura 12: Agitador mecânico usado nos ensaios, marca Sorvall-Omni mixer 17220. Em detalhe, hélice usada na agitação dos frascos medindo 2,5 cm de diâmetro.	47
Figura 13: Critério de análise dos resultados obtidos pelo planejamento de experimentos.....	52

Figura 14: Resultados obtidos na análise de proteína no sobrenadante para os 15 ensaios realizados (Coluna C10).	53
Figura 15: Gráficos que representam análises residuais dos valores obtidos no planejamento. Da esquerda para a direita e de cima para baixo temos os gráficos de Análise Normal, Resíduos versus Valores Ajustados, Histograma e Resíduos versus Ordem de Observação.	54
Figura 16: Resultados dos coeficientes de regressão e Análise de Variância (ANOVA). Em destaque, estão os valores utilizados para análise e interpretação dos resultados.....	55
Figura 19: Resultados obtidos na análise do teor de PHB para os 15 ensaios realizados (Coluna C8).....	56
Figura 20: Gráficos que representam análises residuais dos valores obtidos no planejamento. Da esquerda para a direita e de cima para baixo temos os gráficos de Análise Normal, Resíduos versus Valores Ajustados, Histograma e Resíduos versus Ordem de Observação.	57
Figura 21: Resultados dos coeficientes de regressão e Análise de Variância (ANOVA). Em destaque, estão os valores utilizados para análise e interpretação dos resultados.....	58
Figura 22: Contorno em 2D e 3D da quantidade de proteína total no sobrenadante (mg) considerando os fatores tempo (s) e razão surfactante/biomassa.	60
Figura 23: Contorno em 2D e 3D do teor de PHB (%) considerando os fatores razão EDTA/biomassa e razão surfactante/biomassa.....	61
Figura 24: Contorno em 2D e 3D do teor de PHB (%) considerando os fatores tempo(s) e razão surfactante/biomassa.	62
Figura 25: Condição otimizada para obtenção da maior recuperação de PHB para os 3 fatores tempo, surfactante/biomassa e EDTA/biomassa.....	63
Figura 26: Resultados obtidos na análise de massa molecular (Mw) para os 15 ensaios realizados (Coluna C9).	64

Figura 27: Gráficos que representam análises residuais dos valores obtidos no planejamento. Da esquerda para a direita e de cima para baixo temos os gráficos de Análise Normal, Resíduos versus Valores Ajustados, Histograma e Resíduos versus Ordem de Observação.	65
Figura 28: Resultados dos coeficientes de regressão e Análise de Variância (ANOVA). Em destaque, estão os valores utilizados para análise e interpretação dos resultados.....	66
Figura 29: Contorno em 2D dos fatores teor de PHB e a massa molecular, considerando o fator Tempo nos níveis -1, 0 e 1,	69
Figura 30: Condição otimizada para obtenção de maior teor de PHB e elevada massa molecular para os 3 fatores tempo, razão surfactante/biomassa e razão EDTA/biomassa.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Algumas propriedades típicas do PHB, PHB-HV, PP e PVC.	19
Tabela 2: Composição do óleo de soja	23
Tabela 3: Meio Sólido Ágar Nutriente (AN)	41
Tabela 4: Meio Caldo Nutriente (CN)	41
Tabela 5: Meio Mineral de Fermentação	42
Tabela 6: Níveis de concentração dos reagentes utilizados no estudo de acordo com a nomenclatura de níveis	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

3HV	Hidroxivalerato
AA	Amidoamina
ACP	Proteína acil-carregadora
AN	Agar nutriente
ANOVA.....	Análise de variância
CAB.....	Cocamidopropil betaína
cm	Centímetros
CN	Caldo nutriente
CoA	Coenzima A
D.....	Significância composta
d	Significância individual
Da.....	Dalton
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DMAPA	Dimetilaminopropilamina
EDTA.....	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	Grama
GP	Gliceraldeído-3-fosfato
GPC	Cromatografia de permeação em gel
HPLC.....	Cromatografia líquida de alta eficiência
IP.....	Índice de polidispersão
IPT.....	Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo
L	Litro
ml	Mililitro
µL	Microlitro
m	Metro
µm	Micrometro
nm	Nanometro
MCL.....	Cadeia de comprimento médio
mg	Miligrama
min	Minutos
MMF	Meio mineral de fermentação
Mn	Massa molecular numérica média
Mw.....	Massa molecular ponderal média
N.....	Normal
NADH	Dinucleotido de nicotinamida adenina
NPCM.....	Non-PHB Cell Material
P.....	Coeficiente de probabilidade
P3HB.....	Poli-3-hidroxiбутirato
PA	Para análise
PHA.....	Polihidroxialcanoato
PHB.....	Polihidroxiбутirato
rpm	Revoluções por minuto
S.....	Desvio padrão da regressão
s	Segundos
SCL	Cadeia de comprimento curto
T.....	Temperatura em grau Celsius
Temperatura de transição vítrea em grau Celsius	
v/v.....	Volume/volume

SUMÁRIO

1	OBJETIVO	14
2	INTRODUÇÃO	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1	Plásticos convencionais: vantagens e desvantagens de sua ampla utilização.....	16
3.2	Os polihidroxialcanoatos (PHAs)	17
3.2.1	PHB e suas propriedades	19
3.3	A produção de PHA por fermentação de bactérias.....	20
3.3.1	<i>Cupriavidus necator</i> como produtora de PHB.....	21
3.4	Surfactantes e suas novas tendências.....	25
3.4.1	Betaína: surfactante de origem vegetal e de amplo uso	27
3.5	Recuperação de biopolímeros	28
3.5.1	Métodos de extração	29
3.5.2	Métodos de purificação.....	34
3.6	Metodologia de planejamento de experimentos.....	35
3.7	Superfície de resposta	36
3.7.1	Planejamentos Compostos Centrais.....	37
3.7.2	Planejamentos Box - Behnken.....	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	Microrganismo	40
4.1.1	Esterilização.....	40
4.1.2	Cultura Estoque	41
4.1.3	Preparação do Inóculo.....	41
4.1.4	Cultivo em reator.....	41
4.2	Ensaio de recuperação do PHB	43
4.2.1	Determinação dos fatores dependentes e independentes.....	43
4.2.2	Determinação da estratégia de ensaios.....	44
4.2.3	Recuperação do PHB	45

4.3	Metodologia Analítica.....	47
4.3.1	Determinação da proteína no sobrenadante.....	47
4.3.2	Determinação do teor do PHB.....	48
4.3.3	Determinação da massa molecular.....	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	Ensaio de recuperação do PHB	52
5.2	Tratamento estatístico após execução de experimentos	53
5.2.1	Proteína no sobrenadante	53
5.2.2	Teor de PHB	56
5.2.3	Massa Molecular	64
5.2.4	Análise da condição otimizada.....	67
6	CONCLUSÕES	72
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	74

1 OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo:

- Avaliar e otimizar a rota de recuperação do polímero poli(3 - hidroxibutirato) (PHB), de alta pureza e alto peso molecular, com o uso de surfactante de origem vegetal a partir de *Cupriavidus necator* IPT 26 (DSM545) através da ferramenta de planejamento de experimentos por superfície de resposta.

2 INTRODUÇÃO

Plásticos têm sido produzidos pela indústria química desde meados da década de 30. Eles constituem um grupo muito importante de materiais devido ao seu alto peso molecular e baixa reatividade, tornando-os especialmente adequados para aplicações onde durabilidade e estabilidade química são requeridas. Entretanto, a alta resistência à decomposição biológica causa sua acumulação no meio ambiente.

O reconhecimento dessa dificuldade na disposição dos plásticos impulsionou pesquisas em novos materiais (AMASS *et al*, 1988) que possam se decompor com o tempo após essa disposição, os chamados plásticos biodegradáveis. A maioria desses biopolímeros pertence às classes dos polissacarídeos ou dos polihidroxicanoatos (PHAs).

O primeiro PHA descoberto foi o polihidroxibutirato (PHB). Desde o primeiro relato, a acumulação do PHB em diversos microorganismos vem sendo estudada: espécies Gram-negativas e Gram-positivas (por exemplo: autótrofos, heterótrofos, aeróbios e anaeróbios). As bactérias sintetizam e acumulam os PHAs como fontes de energia e carbono ou como estoques para condições de limitação de nutrientes. Quando o suprimento de nutrientes é restabelecido, o PHA é degradado por depolimerases intracelulares e subseqüentemente metabolizado como fonte de energia. (KESSLER, 1999).

A descoberta do bio-poliéster, que consiste basicamente de monômeros de hidroxioctanoato (SMET *et al*, 1983), foi o primeiro exemplo de um novo grupo de polímeros que podem conter uma variedade de monômeros. Assim, mais de 90 monômeros diferentes já foram encontrados nestes polímeros (STEINBÜCHEL,

1995). Dentre estes estão os 3-hidroxi-ácidos de 6 a 14 carbonos saturados, insaturados e de cadeias alifáticas. Além disso, monômeros com diversos grupos funcionais nas ramificações, como halogênios e grupos hidroxil, epóxi, ciano, carboxil têm sido introduzidos em PHAs de cadeia de médio comprimento (MCL PHA) (STEINBÜCHEL, 1996; SASIKALA *et al*, 1996).

PHAs podem ser classificados em dois grupos dependendo do número de átomos de carbono em suas unidades monoméricas: cadeia de comprimento curto (SCL PHAs), que consistem de 3 a 5 átomos de carbono e MCL PHAs, que consistem de 6 a 14 átomos de carbono (STEINBÜCHEL, 1991). Sua estrutura geral pode ser vista na Figura 1.

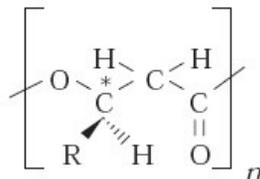


Figura 1: Estrutura geral dos PHAs (polihidroxicanoatos). PHAs são poliésteres com (R)-3-hidroxi ácidos como unidades monoméricas.

As unidades monoméricas desses poliésteres produzidos a partir de microorganismos estão na configuração R devido a estereo-especificidade das enzimas responsáveis pela biosíntese. A massa molar dos PHAs está na faixa de 2×10^5 a 5×10^6 , dependendo do PHA especificamente, do microrganismo gerador do PHA e das condições de cultura.

Entre 1991 e 1999, o Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT-SP), em cooperação com o Centro Tecnológico da Copersucar e Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, desenvolveu um processo biotecnológico de produção de PHB a partir de cana-de-açúcar, especialmente no que tange às etapas de microbiologia, fermentação e separação do produto.

Dentre as etapas de produção industrial desses biopolímeros, a sua recuperação mostra-se igualmente importante por representar uma parcela relevante do custo do processo como um todo (DE KONING *et al*, 1997a). Além disso, o estudo dessa etapa mostra-se muito importante a fim de obter um polímero com alto

grau de pureza e elevada massa molecular, preservando suas propriedades físico-químicas e mecânicas. Possuir elevada massa molecular torna o polímero vantajoso uma vez que durante o processamento de termoplásticos, a massa molecular é reduzida, prejudicando suas propriedades finais.

O processo de recuperação de produtos intracelulares, como os PHAs, requer que, após a separação das células do mosto fermentado, o produto de interesse seja removido da célula. Os métodos adotados para este propósito envolvem a extração do biopolímero, empregando-se solventes clorados (BARHAM e SELWOOD, 1982; HÄNGGI, 1990; RAMSAY *et al.*, 1994), tensoativos (CHEN *et al.*, 2001), hipoclorito de sódio (BERGER *et al.*, 1989; HÄNGGI, 1990; RAMSAY *et al.*, 1990), hidróxido de sódio (LEE *et al.*, 1999) e enzimas (ZUCCOLO, 1996; CHASSY, 1980; KAPRITCHKOFF, 2006) e, caso haja necessidade de aumentar a pureza do PHA, acrescenta-se a etapa de purificação, que pode ser feita usando peróxido de hidrogênio ou tratamento com ozônio (HOROWITZ, 2001).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Plásticos convencionais: vantagens e desvantagens de sua ampla utilização

O crescimento do mercado de plásticos de origem petroquímica nos últimos cinquenta anos, principalmente no que tange a materiais descartáveis, representa um sucesso comercial e tecnológico significativo. No entanto, é exatamente esse “sucesso” o gerador de um crescente e preocupante acúmulo de materiais plásticos no meio ambiente em vista de sua lenta degradabilidade. Foi demonstrado (STEINBÜCHELL, 1991) que o polietileno, sem sofrer fotoxidação prévia, sofre degradação de apenas 0,2% num período de 10 anos, enquanto o mesmo material fotoxidado por 42 dias apresenta, depois de colocado no solo, uma degradação de 2% em 10 anos. Soma-se a esse problema o fato de tais polímeros serem produzidos a partir do petróleo, fonte esgotável de energia e matéria-prima.

Em decorrência disto, vem aumentando a demanda por novas técnicas na tentativa de eliminação deste plástico excedente. As alternativas que vêm sendo

empregadas são a reciclagem, a incineração e, mais recentemente, a tentativa de substituição dos plásticos convencionais pelos biodegradáveis (FRITZ *et al*, 1994).

A reciclagem mostra-se pouco efetiva na produção de plásticos com propriedades adequadas para ampla reutilização em diversas aplicações, como por exemplo, na indústria de alimentos, cujas embalagens devem ser feitas a partir de plástico virgem (não reciclado). A incineração apresenta o inconveniente de requerer gastos substanciais para a instalação de equipamentos resistentes à corrosão causada por resíduos do processo, além de provocar a formação de aerossóis e gases tóxicos, responsáveis por danos ambientais (AMASS *et al*, 1998).

A substituição destes polímeros petroquímicos por biopolímeros biodegradáveis, tendo como importante exemplo os polihidroxicanoatos (PHAs), mostra-se vantajosa. Isso porque esses materiais, além de poderem ser processados através das mesmas técnicas adotadas para os polímeros convencionais, são totalmente biodegradáveis em curtos períodos de tempo de, por exemplo, seis semanas quando em presença de lodo anaeróbio, 75 semanas quando em solo e 350 semanas, quando em água do mar (LEE, 1996), com geração de substâncias inofensivas ao meio ambiente. Além disso, são produzidos a partir de matérias-primas renováveis.

O fator limitante na substituição de polímeros de origem petroquímica por biopolímeros biodegradáveis é o seu custo de produção ainda elevado. Desta forma, mesmo o forte apelo ecológico dos biopolímeros não é suficiente para vencer esta disputa e, exatamente por isso, muito esforço vem sendo despendido no intuito de tornar este processo economicamente viável, pelo aumento da produtividade e rendimento do processo e também pelo desenvolvimento de novas técnicas de recuperação do produto.

1.2 Os polihidroxicanoatos (PHAs)

Polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres acumulados por bactérias na forma de grânulos intracelulares de reserva de carbono e energia, alcançando até 80% de sua biomassa seca. Os PHAs têm despertado grande interesse, pois além de serem biodegradáveis, podem ser produzidos a partir de matérias-primas renováveis como carboidratos e lipídeos, advindos de plantios comerciais, sendo o

poli-3-hidroxi-butirato (P3HB) a molécula mais conhecida e estudada (ANDERSON, 1990). O estudo da recuperação de PHAs constitui etapa de considerável importância no custo do processo de obtenção desses biopolímeros (DE KONING *et al*, 1997b).

Recentes avanços no entendimento do metabolismo e genética da bactéria produtora do PHA e da clonagem de mais de 20 genes da biosíntese do PHA permitiram a construção de vários recombinantes capazes de sintetizar poliésteres, tendo diferentes unidades monoméricas (LEE, 1996). Plantas geneticamente modificadas contendo genes para a síntese do PHA também têm sido desenvolvidas buscando melhorias na produção do PHA.

A característica mais atrativa dos PHAs é a sua biodegradabilidade. Um grande número de microrganismos como bactérias e fungos, isolados de vários meios, excretam depolimerases que degradam a molécula de PHA em monômeros e oligômeros, e os utilizam como fonte de carbono.

A taxa de biodegradação é influenciada por diversos fatores, como a população de microrganismos num determinado meio, a temperatura e as propriedades do plástico a ser degradado. Os produtos finais da degradação do PHA em meio aeróbico são o dióxido de carbono e água, enquanto que o metano é produzido em condições anaeróbicas (LEE, 1996).

Os PHAs têm despertado grande interesse como candidato para plásticos biodegradáveis e /ou biocompatíveis para uma ampla faixa de aplicações. Seu preço é ainda bastante alto, cerca de R\$10,00/kg, para ser usado como um plástico de uso genérico, se considerar que o custo do plástico sintético, como o polipropileno custa cerca de R\$2,00/kg. Diversas estratégias de fermentação para a produção de PHAs com alta produtividade têm sido desenvolvidas nos últimos anos. Isolamento e desenvolvimento de uma rota que produza PHAs em alta escala a partir de uma fonte barata de carbono é crucial. Para que o PHA, no futuro, se torne o material plástico biodegradável com ampla aplicação é necessário que seja desenvolvido processo de produção simples com baixo custo operacional e elevado rendimento do PHA purificado de elevada massa molar.

1.2.1 PHB e suas propriedades

O PHB, um PHA de cadeia curta, apresenta-se como um poliéster linear saturado, totalmente biodegradável, que se comporta como um termoplástico convencional. Algumas de suas propriedades físico-químicas e mecânicas estão listadas na Tabela 1 em comparação com as propriedades do copolímero PHB-HV, do Polipropileno (PP) e do Policloreto de Vinila (PVC). (ALMEIDA, 2005)

O PHB é insolúvel em água e solúvel em alguns solventes apolares como o clorofórmio. O PHB é um material semicristalino com alta cristalinidade, o que dificulta seu processamento e o torna extremamente quebradiço, limitando seu uso como plástico comercial.

Tabela 1: Algumas propriedades típicas do PHB, PHB-HV, PP e PVC.

Propriedades	PHB	PHB-HV (4-20%)	PP	PVC Flexível
Temperatura de fusão (°C)	175	157-102	176	80
Cristalinidade (%)	80	69-39	70	<10
Massa Molecular ($\times 10^5$)	5	6	2	-
Temperatura de transição vítrea (°C)	4	2-8	-10	80
Densidade (g/cm^3)	1.25	1.20	0.905	1.4
Tensão de ruptura (MPa)	40	36	38	20
Alongamento na ruptura (%)	4	-	200-700	200-450

No processo de cristalização, o PHB forma estruturas esferulíticas compostas por uma fase amorfa e outra cristalina. A degradação do polímero ocorre primeiramente na fase amorfa e subsequente na fase cristalina. A taxa de degradação é fortemente influenciada pelo grau de cristalinidade do material assim como sua morfologia. O tamanho dos esferulitos influencia diretamente as propriedades mecânicas do polímero, quanto maiores essas estruturas, mais quebradiço o material, assim como influenciam também a taxa de degradação do polímero. O número de esferulitos, tamanho e estrutura fina dependem da temperatura de cristalização, grandes estruturas são formadas em temperaturas próximas de sua temperatura de transição

vítrea (T_g), enquanto uma grande quantidade de pequenos esferulitos é formada em temperaturas mais baixas.

As principais razões que tornam o PHB quebradiço são:

- A cristalização secundária que ocorre durante o armazenamento à temperatura ambiente forma novas lamelas na fase amorfa;
- Baixa densidade de nucleação, formando grandes esferulitos que provocam rachaduras inter-esferulíticas, deteriorando as propriedades mecânicas;
- Baixa temperatura de transição vítrea baixa, e próxima à temperatura ambiente.

É possível melhorar as propriedades mecânicas do PHB através da adição de plastificantes, lubrificantes e agentes de nucleação, ou misturando o PHB com outros polímeros. Adicionando agentes de nucleação ao PHB, o número de pequenos esferulitos cresce, diminuindo a cristalização secundária, o que torna o PHB menos quebradiço. Com a adição de certos plastificantes, aumenta-se o movimento molecular e conseqüentemente diminui-se a temperatura de transição vítrea.

Além de o PHB ser muito quebradiço, ele tem um custo muito alto de produção quando comparado aos polímeros convencionais. Misturar os polímeros biodegradáveis, como o PHB, com polímeros convencionais já conhecidos, apresenta-se como uma alternativa para a obtenção de materiais com propriedades mecânicas satisfatórias para o comércio, a um custo não muito alto. Deste modo é possível formar misturas poliméricas capazes de substituir polímeros não degradáveis, diminuindo o impacto ambiental causado por esses materiais, porém preservando as propriedades necessárias para certa utilização industrial.

1.3 A produção de PHA por fermentação de bactérias

Os poliésteres podem ser obtidos de 3 maneiras diferentes:

- Processo químico
- Combinação de processo químico e biotecnológico
- Processo biotecnológico

Os processos biotecnológicos fornecem ácidos hidroxialcanóicos, ácidos dicarboxílicos e alquildióis que podem, assim, ser polimerizados por processos químicos; a produção de ácido láctico por bactéria e sua subsequente polimerização são um bom exemplo. De outro modo, vários processos biotecnológicos, como por exemplo, produção fermentativa empregando microrganismos, produção em plantas transgênicas e sínteses *in vitro* empregando enzimas isoladas produzem diretamente PHA.

Diversas bactérias produtoras de PHA podem ser cultivadas em altas densidades celulares, com a concomitante acumulação de PHA. Dentre elas podemos citar *Cupriavidus necator*, *A. latus*, *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas* strain K, *Azotobacter vinelandii* e *P.oleovorans*. Também podemos citar as bactérias modificadas geneticamente, como a *E. coli* recombinante, que produz grandes quantidades de P3HB a partir de glucose e sucrose (STEINBÜCHEL, 1998).

Na maioria das bactérias o PHA é sintetizado e acumulado intracelularmente sob condições desfavoráveis de crescimento, com limitação de nitrogênio, fósforo, magnésio ou oxigênio, e na presença de excesso de fontes de carbono. Isto é muito importante quando se deseja otimizar estratégias de cultivo para obter uma elevada produção volumétrica de PHA.

1.3.1 *Cupriavidus necator* como produtora de PHB

A *Ralstonia eutropha*, reclassificada em 2004 para *Cupriavidus necator* tem sido estudada extensivamente devido a sua habilidade em acumular grandes quantidades de P3HB, 80% em peso de massa seca com glucose como fonte de carbono. (ANDERSON, 1990). Diversas patentes foram publicadas sobre a produção de PHA e sua , produzindo também um copolímero P3HB- 3HV a partir de glucose e uma mistura de glucose e ácido propiônico, que são introduzidos durante a fase de acumulação.

Diversas outras rotas foram estudadas para obtenção de PHA, controlando a concentração de glucose e outras fontes de carbono. Etanol, em mistura com propanol também foi usado para a produção de P3HB usando um mutante da *R. eutropha*, porém baixo rendimento de P3HB foi obtido. (LEE, 1996).

Embora não completamente descrito na literatura, pode-se propor que a biossíntese de PHA's a partir de óleos vegetais por microrganismos seja representada pelas vias metabólicas descritas nas Figuras 2, 3, 4 e 5. Neste caso, inicialmente, a utilização de lipídios como fonte de carbono, ocorreria a cisão dos triglicérides por ação de lípases bacterianas produzindo os ácidos graxos correspondentes e glicerol.

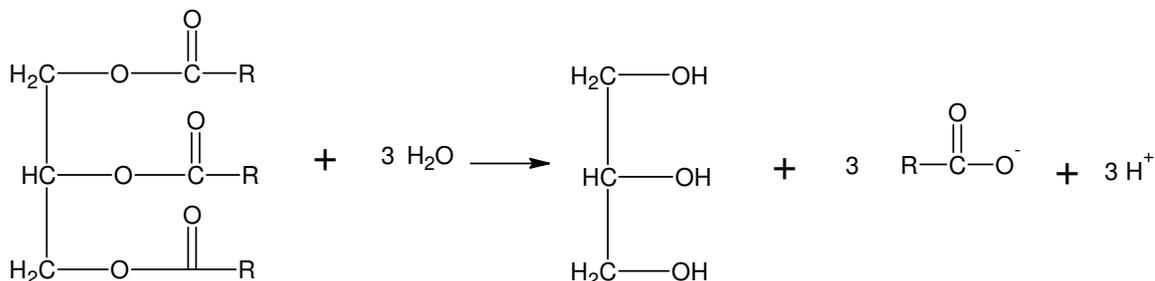


Figura 2: Cisão de triglicérides provenientes de óleos vegetais.

O glicerol formado na hidrólise seria fosforilado e depois oxidado a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) (Figura 3). Este último composto é um intermediário da via glicolítica. A DHAP pode se converter por isomerização em gliceraldeído 3-fosfato (GP), composto pertencente à via glicolítica que será posteriormente convertido a ácido pirúvico. O ácido pirúvico é descarboxilado até acetil-CoA.

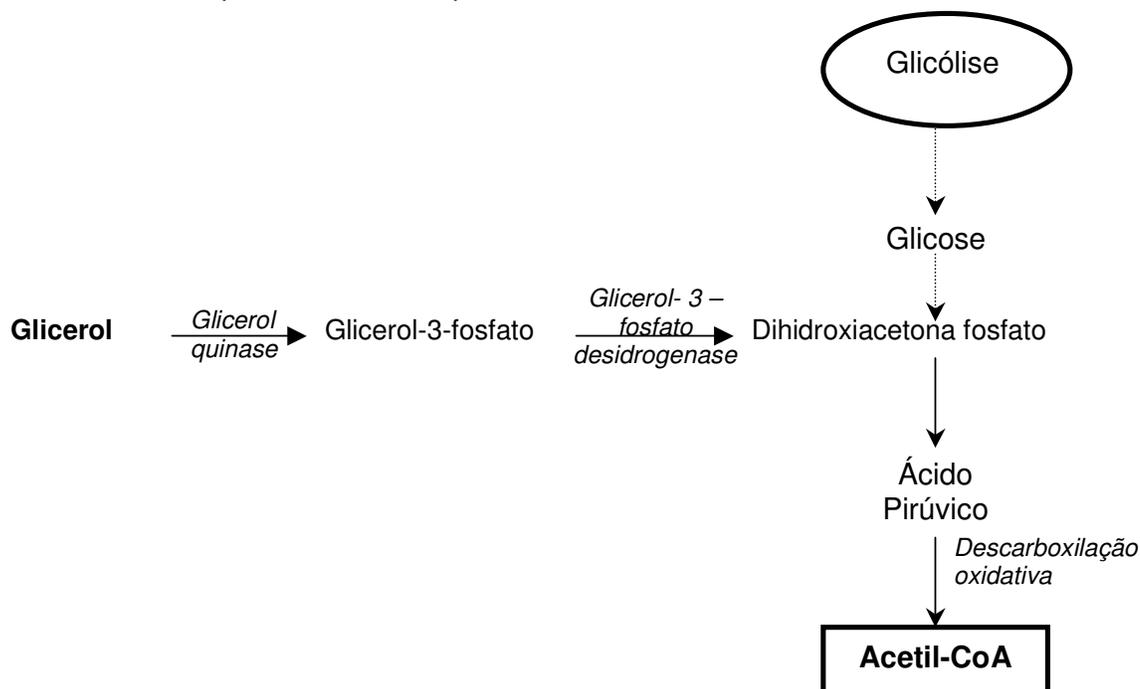


Figura 3: Via catabólica do glicerol

Os ácidos graxos formados na hidrólise dos triacilgliceróis são degradados por uma via catabólica conhecida por β -oxidação. (Figura 4).

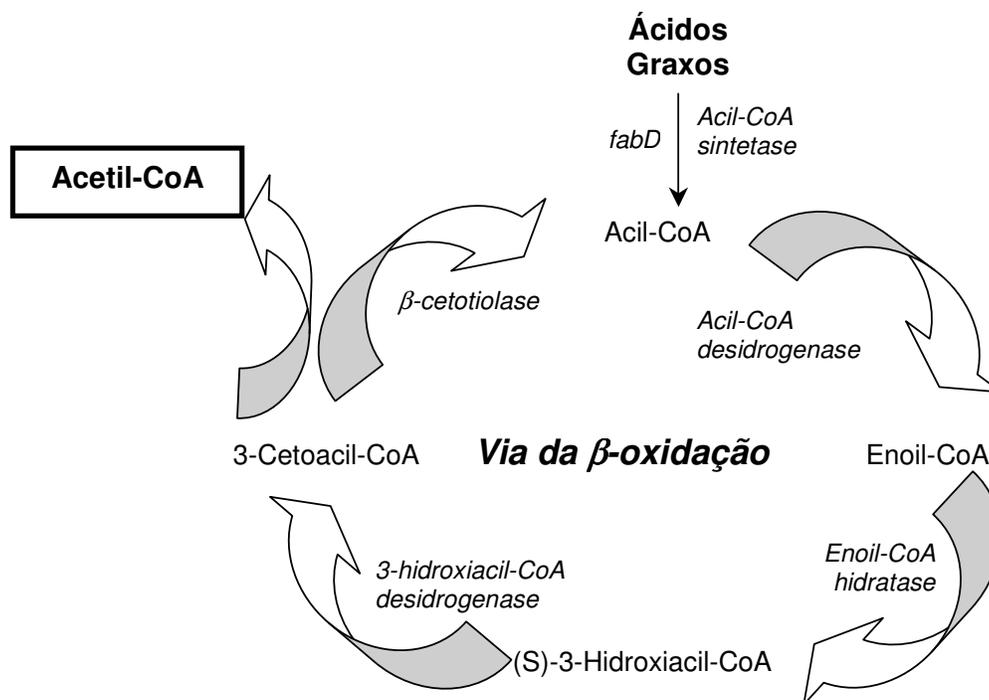


Figura 4: Via metabólica de formação de Acetil-CoA a partir de ácidos graxos. (modificada a partir de PARK *et al.*, <http://mbel.kaist.ac.kr/research/phako.html>)

Para que os ácidos graxos de cadeias longas (Tabela 2) sejam oxidados por esta via, primeiro há a sua ativação ao acil-CoA através da acil CoA sintase.

Tabela 2: Composição do óleo de soja

Ácido Graxo	Número de Carbonos	Número de ligações Duplas	% total de ácidos graxos de óleo de soja
Ácido Palmítico	16	0	11
Ácido Esteárico	18	0	4
Ácido Oléico	18	1	25
Ácido Linoléico	18	2	54
Ácido Linolênico	18	3	7

Fonte: Coodetec: Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola

O acil-CoA saturado é degradado através de quatro reações. A primeira reação em cada ciclo de degradação é a oxidação do acil-CoA por uma acil-CoA desidrogenase, gerando um enoil-CoA com uma dupla ligação trans entre os carbonos C-2 e C-3. A segunda reação é a hidratação da dupla ligação entre C-2 e C-3 através da enoil-CoA hidratase para formar 3-hidroxiacil-CoA. A terceira reação é a oxidação do 3-hidroxiacil-CoA a 3-cetoacil-coA por uma 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase, gerando um NADH. A etapa final é a cisão do 3-cetoacil-CoA produzindo acetil-CoA e um acil-CoA encurtado em dois átomos de carbono, catalisada pela β -cetotiolase. O acil-CoA encurtado passa por outro ciclo de oxidação que se reinicia com a reação catalisada por acil-CoA desidrogenase.

A oxidação dos ácidos graxos com uma insaturação (no óleo de soja = ácido oléico) requer uma enzima isomerase adicional às requeridas no processo já explicado na oxidação de ácidos graxos saturados. E para a oxidação de ácidos graxos polinsaturados (no óleo de soja = linoléico e linolênico) é requerida uma isomerase e uma reductase. (QUEIROZ, 2003).

As unidades de acetil-CoA formadas a partir do glicerol e os ácidos graxos possuem três destinos: o ciclo de Krebs, a biossíntese de P3HB e a biossíntese de ácidos graxos (Figura 5). No caso da biossíntese de P3HB a partir de óleo de soja é provável que estes dois mecanismos produtores do intermediário acetil-coA ocorram concomitantemente. (DELGADO, 2006). Em base da composição ponderal do óleo de soja, é bem provável que o mecanismo prevalente deva ser o mostrado na Figura 4. Enquanto o meio de cultura possui uma composição ilimitada de nutrientes, acetil-coA é desviado principalmente para o ciclo de Krebs para a produção de energia e intermediários que serão utilizados na produção de biomassa celular. Quando uma limitação nutricional (nitrogênio, fósforo magnésio e/ou oxigênio) ocorre no meio de cultura, o crescimento celular diminui ou cessa e o acetil-coA produzido é desviado para a biossíntese de P3HB. Neste caso, duas moléculas de acetil-CoA são convertidas a uma molécula de acetoacetil-CoA por uma β -cetotiolase posteriormente, esta molécula é reduzida a (R)-3-hidroxiacil-CoA por uma 3-cetoacil-CoA reductase NADPH dependente que é em seguida polimerizada a P3HB por meio de uma PHA sintase.

É possível também a transformação de acetil-CoA a malonil-CoA, que entra nesta via de biossíntese de ácidos graxos. O intermediário desta via de síntese, 3-

hidroxiacil-ACP, pode ser convertido a um (R)-3-hidroxiacil-CoA por meio de uma transferase (Figura 5).

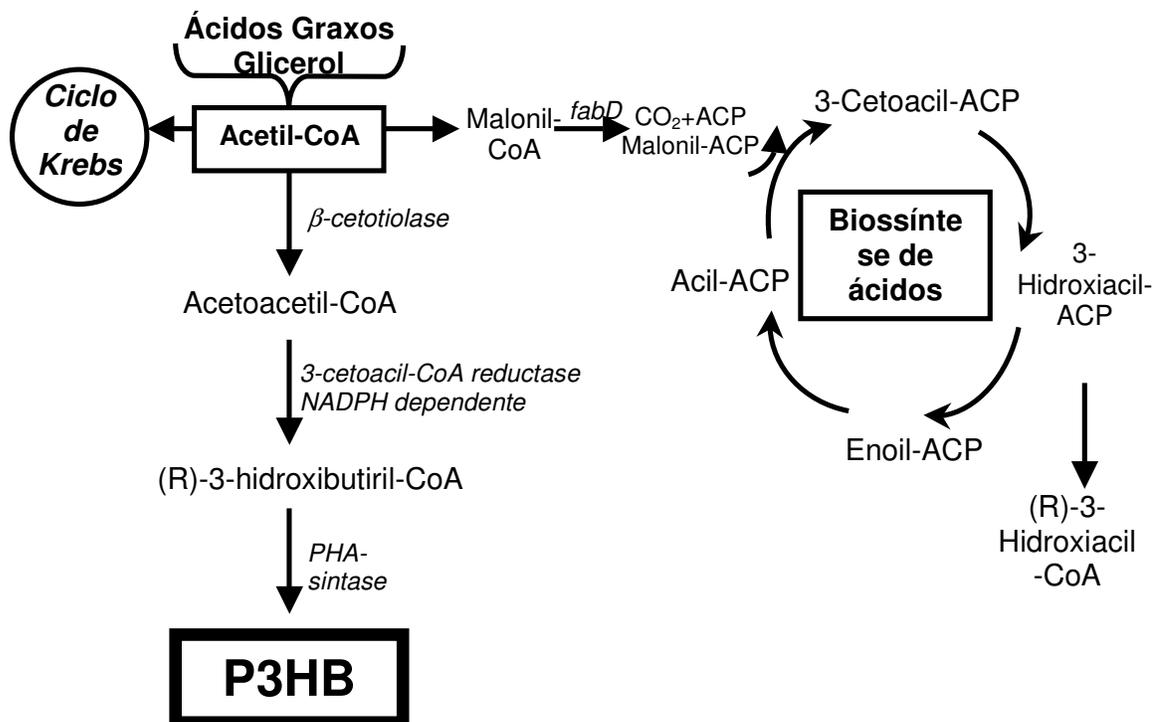


Figura 5: Diferentes destinos da Acetil-CoA proveniente do catabolismo do glicerol e dos ácidos graxos.

1.4 Surfactantes e suas novas tendências

Os surfactantes constituem uma importante classe de compostos químicos por sua vasta aplicação em produtos de limpeza, nas indústrias, em produtos agrícolas e outros. No dia a dia encontramos em detergentes, cosméticos e alimentos, em processos de manufatura como agente antiestáticos e lubrificantes.

Sendo um importante grupo de produtos, os surfactantes sintéticos desempenham um papel significativo na economia e em termos socioeconômicos. Sua produção e uso implicam em impactos na saúde humana e no meio ambiente. Conseqüentemente, diversos órgãos de pesquisa e industriais buscam

constantemente alternativas de produção ambientalmente corretas e seguras que garantam um mínimo risco a saúde e que possam ser produzidas a partir de fontes renováveis. A introdução de produtos mais sofisticados e de alta performance pode também ajudar na redução da emissão de gases de efeito estufa, reduzindo o consumo de energia em sua produção. (DELEU, 2004).

No passado, os surfactantes eram originalmente derivados de fontes renováveis como gorduras e óleos enquanto que hoje são em sua maioria de origem petroquímica. Entretanto, as fontes renováveis possuem grande importância no mercado já que são responsáveis por 1/3 do carbono total em surfactantes, sendo os outros 2/3 provenientes de fontes fósseis. Dentre as fontes renováveis, os óleos representam metade do total de surfactantes produzidos.

Como um total de produção de cerca de 2.5 milhões de toneladas em 2002 (excluindo sabões) (DELEU, 2004), o uso de matérias primas renováveis na produção de surfactantes atualmente excede em muito a quantidade usada para outros fins, dentre estes fins podemos citar a produção de polímeros, lubrificantes e solventes.

Um surfactante pode ser classificado como aniônico (carregado negativamente), catiônico (carregado positivamente), não-iônico (sem carga) e anfótero (contendo ambas as cargas). Os aniônicos e não-iônicos representam o maior volume, e incluem tanto produtos petroquímicos quanto de origem renovável.

As principais matérias-primas renováveis são provenientes de óleos de vegetais tropicais. As legislações atuais não dão nenhuma vantagem competitiva aos surfactantes renováveis ou biosurfactantes, produzidos a partir de microorganismos frente aos de origem petroquímica. Entretanto, políticas adicionais podem aumentar a participação no mercado dos surfactantes de fontes renováveis para mais de 40% até 2010.

Como uma das atividades relativas a essa discussão política, a comissão européia em 2001 avaliou o potencial de diminuição das emissões de gases de efeito estufa aumentando o uso de matérias primas de fontes renováveis. E os surfactantes foram identificados como sendo um grupo que, se produzido de maneira renovável pode contribuir nesta redução. Uma redução ainda maior deverá ocorrer com a introdução de surfactantes produzidos a partir de microrganismos ou de sementes vegetais em larga escala.

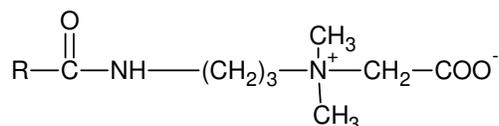
Nestas pesquisas, duas novas estratégias vêm sendo empregadas: a primeira resulta a necessidade de redução nos impactos ambientais já que os surfactantes tradicionais possuem baixa taxa de degradação e alto potencial de toxicidade aquática. A segunda estratégia é desenvolver novas funcionalidades a estas moléculas, como atividade em superfície e capacidade de polimerização em uma única molécula. Por estas razões, estes novos surfactantes se apresentam promissores mesmo se sua performance for ligeiramente inferior ou seu preço maior que os convencionais.

1.4.1 Betaína: surfactante de origem vegetal e de amplo uso

A cocamidopropil betaína (CAB) apresenta em sua molécula caráter hidrófilo, proveniente do grupo betaínico, e lipófilo, resultante da cadeia carbônica do ácido graxo de coco.

O grupo cocamido (lipófilo) é composto por uma mistura de amidas e ácidos graxos do óleo de coco. Como o óleo de coco contém cerca de 50% de ácido dodecanóico, normalmente consideram-se apenas cadeias de 12 carbonos, embora esse número possa variar em muitos casos. Este grupo é também a base estrutural de diversos surfactantes como, por exemplo, as etanolaminas.

Sua fórmula geral pode ser representada pela Figura 6 e seu N° CAS é 61.789-40-0.



onde R = radical do ácido graxo de coco

Figura 6: Fórmula geral da Cocamidopropil betaína.

Sendo uma betaína, a CAB apresenta-se em forma de íon interno com um átomo de nitrogênio quaternário de carga positiva e um grupo acetato com carga negativa, que lhe proporcionam características de tensoativo anfótero. Devido a estas características e a sua capacidade de formar micelas em solução aquosa, a CAB é considerada um excelente co-tensoativo, compatível com tensoativos

aniônicos, catiônicos e não iônicos o que favorece seu uso em formulações de xampus, produtos para banho e cremes de limpeza.

A CAB é normalmente obtida em solução aquosa em concentrações de aproximadamente 30%, considerando os seguintes componentes:

Ingrediente ativo (cocamidopropil betaína) – 29,5-32,5%

Água: 62-66%

NaCl: 4,6-5,6%

Impurezas

Monocloroacetato de sódio <5ppm

Amidoamina (AA) ,0,3%

DMAPA <15ppm

Glicerol < 3%

As impurezas contidas nas principais formulações comercializadas se mostram como as principais responsáveis por reações de irritação e alergias quando usadas em produtos cosméticos.

1.5 Recuperação de biopolímeros

O desenvolvimento de um processo biotecnológico requer o domínio da tecnologia em todas as etapas que o compõem: *screening* das cepas de microrganismos altamente produtivas (seleção natural e engenharia genética), desenvolvimento de processo fermentativo, de recuperação do PHA, bem como a caracterização das propriedades do material produzido e purificado.

A definição das operações de recuperação a serem empregadas dependerá das propriedades do produto de interesse, dos contaminantes presentes no meio, do grau de pureza requerido e das propriedades a serem preservadas no produto. Além disso, confiabilidade nos estudos em escala de bancada e na ampliação de escala, processos com etapas simples e de baixo custo, reduzido tempo de processamento e alto rendimento são igualmente importantes para a definição do processo.

A Figura 7 representa esquematicamente o processo biotecnológico para a obtenção de PHA e as etapas que envolvem o processo de recuperação do PHA: pré-tratamento, extração e purificação.

Muitos estudos têm sido feitos com o intuito de obter PHA em escala industrial, porém os resultados mostraram que estes polímeros são muito mais caros

para produzir quando comparados aos plásticos de origem petroquímica (DE KONING *et al*, 1997b).

Muitas melhorias já foram propostas para aumentar a eficiência do processo de extração, já que esta etapa é a mais cara do processo de recuperação. A etapa de pré-tratamento favorece o rompimento das células durante a extração. E em alguns processos, a etapa de purificação é adicionada buscando elevar a pureza do polímero (JACQUEL, 2008).

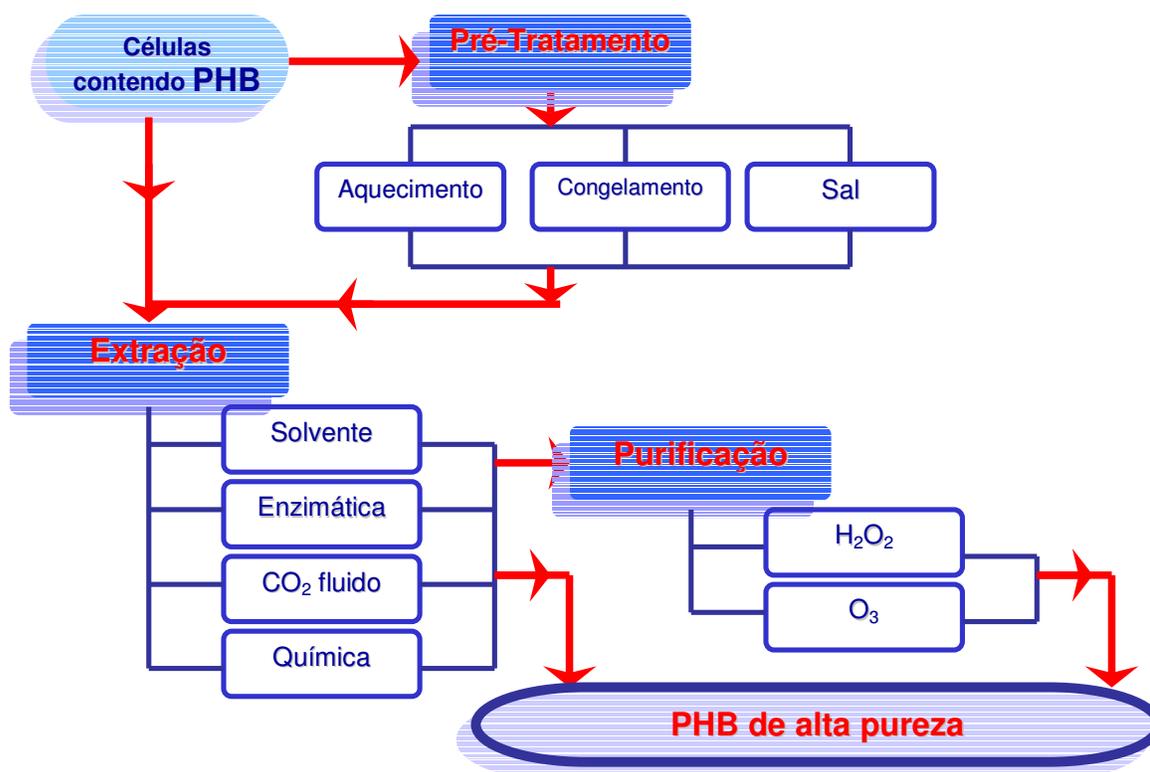


Figura 7: Estratégia de recuperação de PHAs, composta por três processos: pré-tratamento, extração e purificação.

1.5.1 Métodos de extração

Após o processo fermentativo, as células contendo PHA são geralmente separadas do caldo fermentado, seguindo operações comuns aos processos biotecnológicos, como filtração, centrifugação ou ainda floculação seguida de centrifugação (LEE, 1996).

Por serem produtos intracelulares, a recuperação desses polímeros requer que eles estejam liberados do interior das células. Atualmente os processos

adotados para este fim envolvem o rompimento e solubilização do biopolímero do material celular.

Todo cuidado é requerido para evitar a lise do produto de interesse durante este processo. Muitos estudos já realizados demonstraram a queda da massa molecular e conseqüente perda de propriedades físicas de interesse, devido à agressividade dos métodos de recuperação empregados (HOCKING, 1994).

1.5.1.1 Extração por solvente

O uso de solvente na recuperação de PHAs é um dos métodos mais antigos. A ação do solvente pode ser dividida em duas etapas; a primeira modifica a permeabilidade da membrana celular, e a segunda solubiliza o PHA (HÄNGGI, 1990; RAMSAY *et al*, 1994). O uso de solvente foi inicialmente descrito por Lemoigne (LEMOIGNE, 1926), e Baptist (BAPTIST, 1962), em *Bacillus megaterium* e em *Rhodospirillum rubrum*. Eles utilizaram diversos solventes clorados como clorofórmio, 1,2-dicloroetano, cloreto de metileno e alguns carbonatos cíclicos como propileno e etileno. Estes ésteres cíclicos foram também estudados mais tarde por Lafferty *et al* (LAFFERTY, 1978). Baptist também usou em seus estudos misturas de solventes, como clorofórmio/metanol, e dicloroetano/etanol. A separação de PHB foi, então, realizada por evaporação do solvente ou por precipitação com um não-solvente.

Vanlauten *et al* (VANLAUTEN *et al*, 1982) investigaram extrações a partir de *R. eutropha* com solventes halogenados, como cloroetanos e cloropropanos. Eles descobriram que os melhores resultados foram obtidos por solventes nos quais os átomos de carbono funcionais carregam pelo menos um átomo de cloro e um átomo de hidrogênio. Embora estes métodos não produzam alta taxa de recuperação, é possível obter alto grau de pureza. De fato, usando extração por solvente em PHB-PHV a partir da biomassa de *R. eutropha* com cloreto de metileno, é possível obter pureza acima de 98% após concentração por destilação, precipitação por metanol, e recristalização (ZINN, 2003). Noda da Procter&Gamble (NODA, 1998) propôs um processo envolvendo, primeiramente, o tratamento da biomassa com uma mistura de um solvente de PHA e um não-solvente, e posteriormente, a biomassa insolúvel é separada, para finalmente, após a remoção do solvente do PHA, obter o PHA precipitado no não-solvente.

A empresa ICI no Reino Unido inicialmente usava extração por solvente para recuperar PHB, com cloreto de metileno; porém este processo sempre foi considerado muito caro (BYROM, 1990). A solução extraída de polímero que contém mais de 5% em peso de PHB é muito viscosa e a remoção do debrís celular é bastante trabalhosa. Esse é o motivo pelo qual são necessárias cerca de 20 partes de solvente para extrair uma parte de polímero (BYROM, 1990). Esta grande quantidade de solvente gera um alto custo de produção caso não seja feita a reciclagem do solvente. Liddell explorou esta idéia solubilizando PHB em um solvente imiscível em água a altas temperaturas (acima de 120°C). O polímero foi então recuperado pela adição de água fria, e o solvente pôde ser reciclado diversas vezes antes de ser destilado (LIDDELL, 1999).

Porém, o uso de solventes destrói a morfologia natural dos grânulos de PHA que são úteis em algumas aplicações, como na produção de fibras resistentes (BARHAM, 1991). Mas ao contrário de alguns outros métodos de recuperação, a extração por solvente não degrada a cadeia polimérica e pode ser útil para algumas aplicações médicas por eliminar endotoxinas que podem ser encontradas em bactérias Gram negativas. Lee et al (LEE *et al*, 1999) mostrou que a extração de PHB a partir de *E. coli* usando clorofórmio diminui os níveis de endotoxinas para um limite aceitável em PHB.

Outro problema relacionado ao uso de solventes é a toxicidade para operadores e o meio ambiente. Isto é a principal razão pela qual a extração por solvente é largamente usada em laboratórios, porém com limitado sucesso em plantas piloto e em processos de larga escala. Com o intuito de minimizar estes efeitos, um método de extração usando solventes não-halogênicos foi introduzido por Kurdikar et al (KURDIKAR *et al*, 2000). Eles usaram álcoois, ésteres, amidas e cetonas de cadeias longas (4-10 carbonos) em diversas temperaturas. Outras melhorias ainda podem ser desenvolvidas para minimizar as desvantagens do uso de solventes, como o uso de modelos de misturas, buscado por solventes menos agressivos.

1.5.1.2 Extração enzimática

O método de extração enzimática foi desenvolvido por Zeneca (subsidiária da ICI) (HOLMES, 1990) como uma alternativa para a extração por solvente. De fato, algumas variedades de enzimas como enzimas proteolíticas possuem alta atividade na dissolução de proteínas, mas mínimo efeito na degradação do PHA. Um típico processo de recuperação inicia-se com pré-tratamento por aquecimento, seguido pela lise enzimática, tratamento com surfactante e descoloração final com peróxido de hidrogênio (HOLMES, 1990). Embora o uso de enzimas produza altos níveis de recuperação, seu alto custo é a principal desvantagem desta tecnologia. A recuperação enzimática da biomassa de *R. eutropha* também foi investigada por Kapritchkoff et al (KAPRITCHKOFF *et al*, 2006). Após avaliar a eficiência de diversas enzimas, os melhores resultados obtidos foram de 88,8% de pureza com 2,0% de bromelina (massa de enzima por biomassa), cujo custo é de cerca de R\$ 160/kg, a 50°C e pH 9,0. Outros experimentos também foram feitos com pancreatina (três vezes mais barata que a bromelina), produzindo um polímero com 90,0% de pureza. (KAPRITCHKOFF *et al*, 2006).

Métodos combinados envolvendo enzimas e hipoclorito de sódio foram investigados, a partir da biomassa de *Burkholderia sp.* PTU9 (LU, 2006). A pureza de 89% e recuperação de 78% foram obtidas usando papain (protease). De Koning et al (DE KONING *et al*, 1997a) propôs um método combinado envolvendo tratamento por aquecimento, seguido de Alcalase (enzima) e SDS (dodecil sulfato de sódio) com EDTA para a recuperação de PHA a partir da biomassa de *Pseudomonas*. O teor de PHA final foi superior a 95% (pureza). A escolha das condições ótimas de operação foi feita após testar diversas enzimas (Alcalase, Neutrase, Lecitase, Lisosima), combinadas com hipoclorito, EDTA, SDS, calor e tratamento alcalino. (DE KONING *et al*, 1997a).

1.5.1.3 Extração por CO₂ fluido supercrítico

Fluidos supercríticos possuem propriedades físico-químicas únicas, como alta densidade e baixa viscosidade, o que os torna muito apropriados para utilização como solventes para extração. Com este intuito, CO₂ é o mais amplamente usado devido a sua baixa toxicidade e reatividade, temperatura crítica e pressão moderada (31°C a 73 atm), grande disponibilidade, baixo custo e não-inflamável (HEJAZI, P. *et al*, 2003). Hejazi et al estudou a recuperação de PHB a partir de *Ralstonia eutropha*

e seus resultados mostraram que as condições adequadas para a extração são 100 minutos de exposição, a pressão de 200 atm, temperatura de 40°C e 0,2 mL de metanol. A taxa de recuperação obtida usando CO₂ fluido é similar a obtida por outros métodos: 89% (HEJAZI, P. *et al*, 2003).

1.5.1.4 Extração química

Os métodos que envolvem a extração do PHB por via química utilizam de modo geral as seguintes rotas: digestão por surfactantes (CHEN, 2001; KIM, 2003), hipoclorito de sódio (BERGER *et al*, 1989, RAMSAY *et al*, 1990, HÄNGGI, 1990, HAHN *et al*, 1994), hidróxido de sódio (LEE, 1999) e agentes quelantes como EDTA.

Os surfactantes, como o SDS (dodecil sulfato de sódio) rompem as células ao se incorporarem na bicamada lipídica da membrana celular. À medida que se adiciona mais surfactante, ele aumenta o volume celular até a sua saturação, que quebra a membrana para produzir micelas de surfactante e fosfolípidios de membrana, promovendo a liberação do PHB para a solução, junto com debris celular (CHEN, 2001). Porém, somente o uso do surfactante não é suficiente para recuperar o PHB com alta pureza (>95%). Assim, o uso de outros agentes como hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio são necessários. Além disso, altas doses de surfactante (acima de 5% em peso) aumentam os custos de recuperação e causa problemas no tratamento da água de produção e reuso.

Outro método químico de extração promove o uso de hipoclorito de sódio na digestão de materiais celulares, exceto PHB. Com este método, Hahn *et al* obtiveram PHA de pureza: 86% com *R. eutropha* e 93% com *E. coli* recombinante. Porém, hipoclorito de sódio causa degradações severas à molécula de PHB, resultando numa redução de 50% na massa molecular (HAHN, 1994).

Em 1999, uma combinação de tratamento com agente quelante e peróxido de hidrogênio foi estudado em copolímero PHB-HV produzido a partir de *R. eutropha* (LIDDELL, 1999). A recuperação do copolímero de PHA foi iniciada pelo tratamento térmico a 150°C, pH 6.5 por 80 s, seguida pela adição do agente quelante (EDTA) e peróxido de hidrogênio. Após 10h, o copolímero com pureza de 99.5% foi recuperado por centrifugação (LIDDELL, 1999).

Todos os métodos citados acima, apesar da vantagem da extração de um pó branco altamente cristalino, com massa molecular relativamente elevada, apresentam o inconveniente de, além de serem custosos, envolvem a utilização de quantidades elevadas de agentes de recuperação que podem ser tóxicos e algumas vezes explosivos tanto para a extração como para a precipitação do polímero. E em alguns casos, estes métodos requerem a adição da etapa de purificação para obter polímeros com maior pureza. E é nestes inconvenientes que o uso da betaína, surfactante de origem vegetal tem seu diferencial: sua baixa toxicidade, baixo custo e fácil manipulação fazem de seu emprego na recuperação uma importante arma a ser estudada para viabilizar industrial e comercialmente a ampliação do uso dos biopolímeros em diversas aplicações cotidianas, reduzindo seu custo total de produção.

1.5.2 Métodos de purificação

Os métodos mais comuns de purificação envolvem tratamento com peróxido de hidrogênio combinado com ação de enzimas e agentes quelantes. Recentemente, o método de purificação com uso de ozônio foi proposto por Horowitz et al (HOROWITZ, *et al*, 2001). Este método foi estudado como uma etapa de purificação buscando aumentar a pureza do polímero. Para este fim, ozônio foi introduzido na solução com biomassa em um fluxo de oxigênio contendo de 2 a 5% de ozônio. O tratamento com ozônio possui ainda benefícios adicionais como branqueamento, desodorização e solubilização de impurezas, facilitando sua remoção das suspensões aquosas de polímero. Este método pode substituir o tratamento com peróxido de hidrogênio, que possui diversas desvantagens: altas temperaturas de operação (80-100°C), instabilidade do peróxido na presença de altos níveis de biomassa e diminuição da massa molecular do polímero (HOROWITZ, *et al*, 2001).

A proposta deste trabalho é recuperar o PHB produzido a partir de *C. necator* sem o uso da etapa de purificação adicional, dando ao método vantagem competitiva no custo total da operação.

1.6 Metodologia de planejamento de experimentos

A ferramenta estatística de planejamento de experimentos é amplamente usada na indústria para investigar sistematicamente as variáveis de processos e produtos que influenciam a qualidade/quantidade do produto final. Após identificar as condições de processo e os componentes do produto que influenciam a qualidade final, é possível direcionar esforços a fim de melhorar a processabilidade, a confiabilidade e o desempenho como um todo.

Como na maioria das vezes os recursos são limitados, é importante obter o máximo de informação de cada experimento realizado. Experimentos bem planejados podem gerar mais informação e freqüentemente requerem um menor número de corridas do que experimentos não planejados. No caso de haver interação entre duas variáveis, por exemplo, é possível incluir essas variáveis ao mesmo tempo no planejamento, ao invés de estudá-las em separado. Essa interação ocorre quando o efeito de uma variável é influenciado pelo nível (aumento ou diminuição) da outra variável.

O método ainda comum de experimentação é a variação de fatores em separado, ou seja, variando um por vez. E a maior desvantagem deste método é justamente a impossibilidade de avaliar possíveis interações entre fatores.

Os principais métodos de planejamento de experimentos são:

- **Fatorial:** método que permite um estudo simultâneo dos efeitos que diversos fatores podem ter durante o processo em questão. Quando realizamos um ensaio variando os níveis dos fatores simultaneamente ao invés de um por vez, maior é a eficiência de tempo e custo, além de permitir um estudo das interações entre os fatores. Sem utilizar o planejamento fatorial, diversas interações não seriam nem ao menos detectadas.

- **Superfície de Resposta:** método para planejar, analisar e otimizar múltiplas respostas, o que ajuda a identificar a melhor condição considerando simultaneamente diversos fatores e respostas. Geralmente empregado quando se deseja obter as condições otimizadas do processo, após a identificação dos principais fatores que influenciam esse processo. Utiliza fatorial e pontos centrais em sua análise.

- **Mistura:** método baseado na superfície de resposta onde as proporções dos componentes (fatores) são mais importantes que sua magnitude. Por isso é amplamente usado na indústria na otimização de formulações e misturas.
- **Taguchi:** também chamado de planejamento com arranjos ortogonais, com planejamentos robustos e diversos arranjos. Frequentemente usado para criar produtos numa condição de operação já existente.

1.7 Superfície de resposta

Este método é usado para examinar a relação entre uma ou mais respostas de variáveis e um conjunto de fatores experimentais. Ele é frequentemente empregado quando se deseja obter as condições otimizadas após a identificação dos principais fatores que influenciam o processo. E é frequentemente empregado para:

- Encontrar os parâmetros de um fator (condições de operação) que produzem a melhor resposta que satisfaçam uma operação ou uma especificação de processo;
- Identificar novas condições de operação que promovam melhoria na qualidade do produto;
- Identificar relações entre fatores quantitativos e a resposta procurada.

Na metodologia de planejamento por superfície de resposta, o número de fatores não é uma restrição, nem o número de respostas, pois ela pode ser aplicada a qualquer número de fatores, assim como modelar várias respostas ao mesmo tempo. Esta é uma característica importante, porque muitas vezes um produto ou processo tem de satisfazer mais de um critério, como, por exemplo, apresentar máximo rendimento com o mínimo de impurezas, ou ter custo mínimo, porém mantendo os parâmetros de qualidade dentro das especificações.

As principais etapas do planejamento por superfície de resposta são seqüenciais e necessitam mais que uma etapa de experimentação e análise. Dependendo do experimento a ser realizado, as etapas abaixo podem estar em ordem diferente ou mesmo eliminar algum passo.

O primeiro passo é determinar o tipo de planejamento mais apropriado para o experimento. Escolhendo o planejamento corretamente, o método irá fornecer melhores resultados. Os principais planejamentos são:

- Compostos centrais
- Box-Behnken

Os próximos passos após a escolha do planejamento são:

- Identificar o número de fatores de interesse;
- Determinar o número de corridas a ser realizado;
- Assegurar a correta escolha da região de interesse a ser investigada;
- Determinar o impacto que outras considerações como tempo, custo, disponibilidade de materiais e equipamentos tem em seu planejamento.

Dependendo do problema, existem outras considerações a serem feitas. A chave é encontrar o planejamento que tenha um desempenho consistente no critério que se considera importante.

1.7.1 Planejamentos Compostos Centrais

Os planejamentos compostos centrais são freqüentemente recomendados quando um planejamento exige uma experimentação seqüencial uma vez que estes experimentos podem incorporar informações de um fatorial adequadamente planejado. O fatorial e os pontos centrais servem como uma etapa preliminar onde se pode adequar um modelo de primeira ordem (linear), mas ainda sim fornecer evidências com relação à importância do modelo de segunda ordem (curvatura).

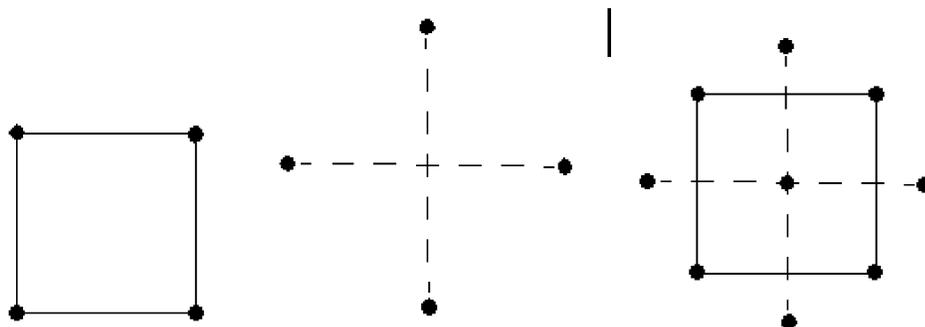
Assim, constrói-se a porção fatorial do planejamento composto central para adequar um modelo de segunda ordem adicionando pontos axiais e centrais, o que permite uma estimativa eficiente dos termos quadráticos do modelo de segunda ordem, e também a obtenção das propriedades desejadas do planejamento de um bloco de experimentos ortogonais (cúbicos) e rodáveis.

Outro termo a ser comentado é o conceito de rotabilidade. Um planejamento é chamado de rotacional se a variância de suas estimativas só depender da distância

em relação ao ponto central, isto é, se a precisão da resposta prevista for a mesma em todos os pontos situados numa dada esfera com o centro no próprio centro do planeamento.

Assim, o planeamento composto central consiste em:

- Pontos fatoriais 2^k ou 2^{k-1} (também chamados de pontos cúbicos) onde K é o número de fatores
- Pontos axiais
- Pontos centrais



Os pontos da porção fatorial do planeamento são codificados em -1 e 1 .

Os pontos da porção axial (estrela) do planeamento são: $(+\alpha, 0)$, $(-\alpha, 0)$, $(0, +\alpha)$, $(0, -\alpha)$

Aqui, as porções fatorial e axial são mostradas em relação ao ponto central. O centro do planeamento está em $(0,0)$.

Figura 8: Esquema de um planejamento composto central para 2 fatores. Os pontos no diagrama representam as corridas a serem realizadas.

1.7.2 Planeamentos Box - Behnken

O planeamento Box-Behnken é recomendado quando se deseja realizar os experimentos de maneira não-sequencial, isto é, planeja-se realizar o conjunto de experimentos uma única vez. Estes planeamentos permitem uma estimativa eficiente dos coeficientes de primeira e segunda ordem. Por terem menos pontos no planeamento (menos ensaios), o custo deste planeamento costuma ser menor

comparado ao planejamento composto central com o mesmo número de fatores sendo estudados.

Este planejamento pode também ser útil se a zona de operação do processo em estudo é conhecida. Os planejamentos compostos centrais normalmente possuem pontos axiais fora do “cubo”, e estes pontos podem não estar na região de interesse, ou podem ser impossíveis de serem ensaiados por justamente estarem fora da zona de operação. O planejamento Box-Behnken não possui pontos axiais, assim, é possível ter certeza que todos os pontos de seu experimento estarão dentro da zona de operação. Além disso, os fatores jamais serão ajustados em seus maiores níveis simultaneamente.

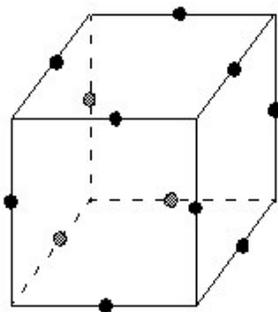


Figura 9: Esquema do planejamento Box-Behnken para 3 fatores. Os pontos no diagrama representam as corridas a serem realizadas.

Dentre os principais métodos de planejamento de experimentos descritos até então, o método de superfície de resposta é o mais adequado quando se deseja otimizar as condições de um processo. Quando comparado ao método fatorial, ele se mostra mais completo por gerar respostas gráficas e extrapolações de regiões não cobertas pelos pontos experimentais sem adicionar muito mais pontos; e quando comparado ao método Taguchi, ele se mostra menos trabalhoso e custoso, por não incluir arranjos complexos que geram custos adicionais, sem agregar muito valor.

Sendo assim, objetivando a otimização do método da recuperação do PHB ao menor custo, optou-se por utilizar o método de superfície de resposta Box - Behnken no desenvolvimento deste trabalho.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Visando estudar e otimizar o processo de recuperação de PHB produzido por *Cupriavidus necator* IPT 26 (DSM545) foi proposto o método por digestão alcalina aliada a betaína, um surfactante de origem vegetal (ácido graxo de coco) através da ferramenta estatística de planejamento de experimentos por superfície de resposta Box-Behnken. Com este método, buscou-se obter máxima pureza e máxima massa molecular do PHB a ser extraído pelo método de recuperação proposto.

Em um dos métodos citados em literatura (CHEN *et al*, 1999) utilizou-se uma solução alcalina de surfactante (betaína) e EDTA e analisaram-se os fatores que influenciaram a taxa de recuperação e a massa molecular do PHB recuperado, porém sem o uso de qualquer tratamento estatístico. Este estudo foi utilizado como base inicial para a otimização da recuperação proposta.

Neste capítulo da dissertação serão descritos os procedimentos adotados na condução dos ensaios, bem como as metodologias de análise e cálculos a eles relacionados.

1.8 Microrganismo

O microrganismo empregado nesse estudo foi a bactéria *Cupriavidus necator* da linhagem IPT-26 (DSM545), pertencentes à coleção de cultura do LBI-IPT. Esta cultura, após sua produção, foi preservada por liofilização e conservada em geladeira. As linhagens utilizadas foram escolhidas em base aos seus bons rendimentos de produção de biopolímero utilizando como fonte de carbono outros carboidratos. (NONATO *et al*, 2001; GOETHE *et al*, 1999).

1.8.1 Esterilização

Soluções e meios de cultura foram esterilizados em autoclave por 20 minutos. O óleo de soja foi esterilizado em forno Pasteur a 180°C por 1 hora.

1.8.2 Cultura Estoque

A partir das culturas de células liofilizadas armazenadas foram semeados em tubos contendo Agar Nutriente (AN) inclinado (Tabela 3) e incubados em estufa a 30°C.

Tabela 3: Meio Sólido Ágar Nutriente (AN)

Componente	Concentração (g/L)
Extrato de carne	3
Peptona bacteriológica	5
Agar bacteriológico	20

A cultura destes tubos foi reativada em meio Caldo Nutriente (CN) (Tabela 4) em Erlenmeyer, levado ao agitador rotativo a 200rpm e 30°C por 15h. Após o cultivo, volumes iguais de cultura e glicerol (100%) foram dispostos em tubos de Eppendorf esterilizados e armazenados em freezer a -80°C.

Tabela 4: Meio Caldo Nutriente (CN)

Componente	Concentração (g/L)
Extrato de carne	3
Peptona bacteriológica	5

1.8.3 Preparação do Inóculo

Foi retirado cerca de 0,5 mL da cultura estoque mantida em freezer a -80°C e inoculado em meio CN em frascos de Erlenmeyer, em agitador rotativo a 200rpm e 30°C por 22h. Em seguida, transferiu-se esta suspensão para CN na base de 10% de seu volume, incubando-se novamente em agitador rotativo a 200rpm e 30°C por 22h. A cultura resultante foi utilizada como inóculo para a fermentação.

1.8.4 Cultivo em reator

O cultivo foi realizado segundo DELGADO, 2006. Inicialmente, foi feita a adição de 0,8L do inóculo ao reator contendo Meio Mineral de Fermentação (MMF) (Tabela 5). O crescimento celular foi conduzido em batelada de 8L de meio de fermentação, em fermentador Biostat Braun modelo ED, com dorna de 10L de

volume nominal; a temperatura e o pH foram controlados em 30°C e 7,0 respectivamente, e oxigênio dissolvido acima de 20% da saturação.

Amostras foram coletadas periodicamente para determinação de concentração de biomassa total (Xt), teor de polímero acumulado (%P3HB), concentração de nitrogênio (N) e estimativa de óleo de soja consumido, bem como realização do balanço dos gases de entrada e efluente (CO₂ e O₂) nos ensaios realizados em biorreatores. A medição destes fatores visou acompanhar o andamento da fermentação.

Tabela 5: Meio Mineral de Fermentação

Componente	Concentração (g/L)
Óleo de Soja	5,0
KH ₂ PO ₄	1,5
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	3,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01
Citrato Férrico amoniacal	0,06
Solução de elementos –traço*	1mL/L
NaCl	1,0

* H₃BO₃ 0,3g/L; CoCl₂.6H₂O 0,2g/L; ZnSO₄. 7H₂O 0,1 g/L; MnCl₂.4H₂O 30,0mg/L; NaMoO₄.2H₂O 30,0 mg/L; NiCl₂.6H₂O 20,0 mg/L; CuSO₄.5H₂O 10,0 mg/L.

O final da fermentação foi identificado quando toda a fonte de carbono (óleo de soja) foi consumida; neste instante, notou-se uma queda brusca na vazão de oxigênio, na velocidade de agitação e a velocidade de consumo de oxigênio, em vista da interrupção do crescimento celular.

Ao final do cultivo, foi realizado um tratamento térmico do mosto fermentado com as seguintes finalidades: desnaturação da enzima PHA-despolimerase, que ao final do cultivo, em vista da ausência de nutrientes no meio reacional, daria início à degradação do biopolímero de interesse; desnaturação do material genético que originaria problemas reológicos ao ser liberado com o rompimento das células.

Após o tratamento térmico a 80°C, as células foram liofilizadas com o intuito de conservar o material celular e ao mesmo tempo obter um material padrão a ser empregado em todos os ensaios planejados de recuperação de PHB.

Assim, nomeou-se a biomassa de estudo de IPT 26 IV, produzida em 29/09/2006.

1.9 Ensaios de recuperação do PHB

1.9.1 Determinação dos fatores dependentes e independentes

De acordo com a metodologia de planejamento de experimentos por superfície de resposta Box-Behnken, é necessária a determinação dos fatores dependentes e independentes do estudo, ou seja, fatores que serão mantidos constantes durante os ensaios, e os fatores cuja influência no processo será avaliada, variando cada um deles em 3 níveis de maneira eficiente:

Nível inferior.....	nomenclatura -1
Nível intermediário.....	nomenclatura 0
Nível superior.....	nomenclatura 1

No processo de recuperação de PHB, os principais fatores que influenciam são:

- pH
- temperatura
- concentração dos reagentes
- tempo
- velocidade de agitação do sistema

O método proposto neste trabalho consiste na recuperação de PHB empregando-se surfactante de origem vegetal (ácido graxo de coco) em meio alcalino. Assim, a concentração de cada nível de cada reagente teve que ser determinada.

Segundo os principais estudos sobre este tema (CHEN *et al*, 1999, KAPRITCHKOFF, 2006, KIM *et al*, 2003), através de cinéticas, estudos de variação de pH e variação de temperatura, os parâmetros de pH, temperatura e velocidade de agitação do sistema podem ser fixados de maneira efetiva já que sua influência na recuperação é bastante conhecida e pode ser facilmente controlada, uma vez que tais respostas desses parâmetros são intrínsecas da célula bacteriana que se deseja estudar.

Assim, como parâmetros independentes têm-se o pH, fixado em 13, a temperatura, fixada em 50°C, e a agitação fixada em 2000 rpm (CHEN *et al*, 1999). Essa correlação também pôde ser feita, pois a bactéria utilizada por CHEN *et al* é da mesma linhagem da bactéria utilizada neste estudo.

Assim, as concentrações dos principais reagentes: g surfactante/ g biomassa, g EDTA (sal)/ g biomassa, e o tempo foram escolhidos como fatores dependentes, ou seja, fatores que seriam avaliados em 3 níveis.

Tabela 6: Níveis de concentração dos reagentes utilizados no estudo de acordo com a nomenclatura de níveis

EIS	NÍV	Surfactante/Biomassa (g/g)	EDTA/Bio massa (g/g)	Tempo (s)
	+1	0,30	0,1	700
	0	0,18	0,05	400
	-1	0,06	0	100

1.9.2 Determinação da estratégia de ensaios

Neste estudo, o planejamento de experimentos por superfície de resposta Box-Behnken foi realizado utilizando-se o software Minitab® versão 15. A nomenclatura de níveis descrita no item anterior é a forma utilizada para determinar as condições de cada ensaio. O método de superfície de resposta Box – Behnken exige o mínimo de 15 ensaios para que seja possível estudar os 3 fatores em seus 3 níveis cada, e também que estes ensaios sejam realizados de maneira aleatória, minimizando quaisquer erros sistemáticos e não inerentes ao sistema estudado.

↓	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
	StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	Surfactante/Biomassa	EDTA/Biomassa	Tempo	Teor de PHB	MW	Proteína no sobrenadante
1	10	1	2	1	0	1	-1			
2	7	2	2	1	-1	0	1			
3	3	3	2	1	-1	1	0			
4	8	4	2	1	1	0	1			
5	15	5	0	1	0	0	0			
6	1	6	2	1	-1	-1	0			
7	9	7	2	1	0	-1	-1			
8	11	8	2	1	0	-1	1			
9	2	9	2	1	1	-1	0			
10	5	10	2	1	-1	0	-1			
11	13	11	0	1	0	0	0			
12	6	12	2	1	1	0	-1			
13	14	13	0	1	0	0	0			
14	12	14	2	1	0	1	1			
15	4	15	2	1	1	1	0			

Figura 10: Planilha de ensaios que será utilizada neste estudo. A coluna C1 indica a ordem padrão dos ensaios; a coluna C2 indica a ordem em que os ensaios deverão ser conduzidos para garantir a randomização; a coluna C3 e C4 são parâmetros que serão usados no tratamento estatístico dos dados; e nas colunas C8, C9 e C10 serão adicionados os resultados obtidos de cada ensaio para efetuar a análise estatística.

1.9.3 Recuperação do PHB

A estratégia utilizada para condução dos 15 ensaios deste estudo segue os procedimentos descritos na Figura 11.

Em tubos centrífuga Falcon de 50 mL numerados de 1 a 15, adicionou-se 950 μ L de solução de NaOH 5 mol.L⁻¹ (pH 13); 0,0 mL, 1,67 mL e 1,34 mL de solução EDTA 0,2 mol.L⁻¹; e 0,2 mL, 0,6 mL e 1 mL de solução 30% betaína marca Alkolan (Oxiten). Cada componente foi adicionado seguindo as concentrações descritas da Tabela 5. Todos os reagentes utilizados, exceto a betaína, são da marca Merck. Após a adição dos reagentes, 1g de biomassa seca IPT 26IV foi adicionada em cada frasco. Cada ensaio foi realizado seguindo a ordem descrita na Figura 10.

Após a adição dos reagentes, cada frasco foi mantido sob agitação mecânica (Figura 12) na velocidade de 2000rpm em tempos que variaram de 100s, 400s e 700s, utilizando o agitador mecânico marca Sorvall-Omni mixer 17220.

Cada frasco foi submetido à centrifugação a 3000rpm por 15 minutos (centrífuga Eppendorf modelo 5810R) a fim de se separar o sobrenadante e o pellet. Nesta etapa, separou-se cada sobrenadante em tubos centrífuga Falcon de 50mL separados para a análise de proteína no sobrenadante 1 a 15.

O pellet separado foi então ressuspendido em água desmineralizada e centrifugado a 3000rpm por 15 minutos. Após este período, cada pellet foi congelado e posteriormente submetido a análise de teor de polímero e massa molecular.

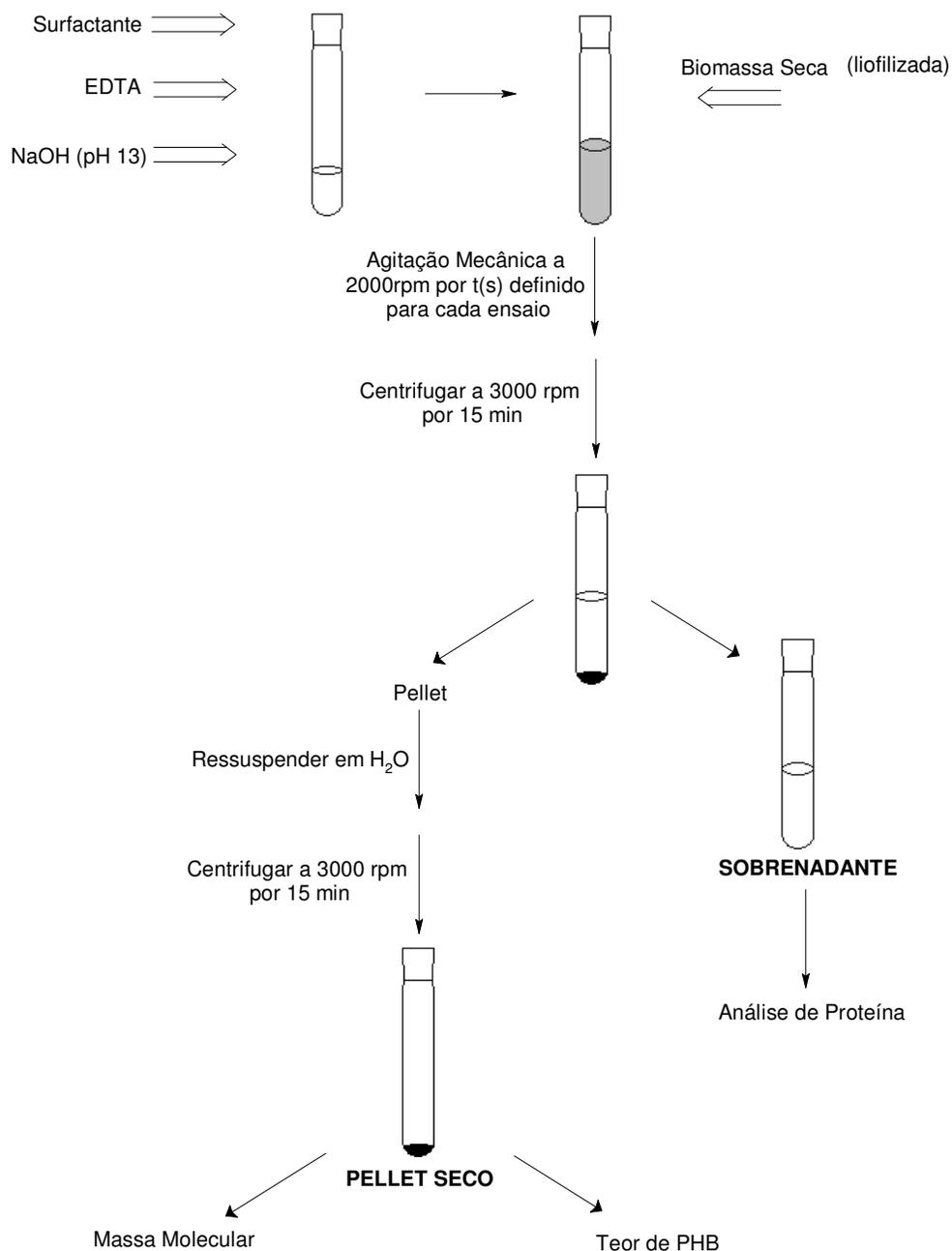


Figura 11: Esquema em fluxograma dos ensaios de recuperação

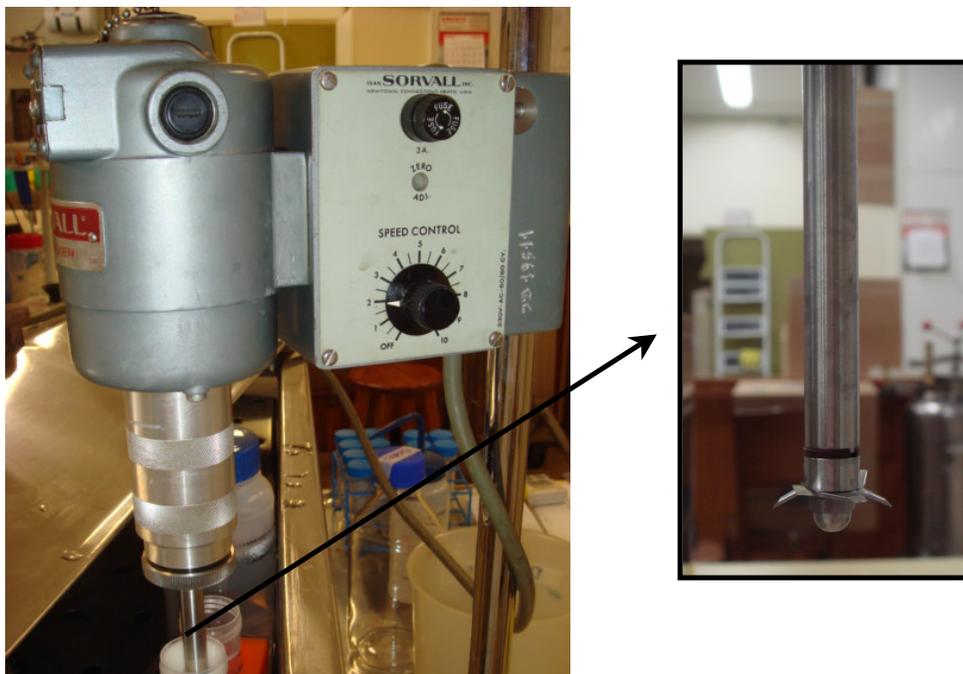


Figura 12: Agitador mecânico usado nos ensaios, marca Sorvall-Omni mixer 17220. Em detalhe, hélice usada na agitação dos frascos medindo 2,5 cm de diâmetro.

1.10 Metodologia Analítica

1.10.1 Determinação da proteína no sobrenadante

As amostras da biomassa retiradas após os ensaios de recuperação foram analisadas quanto à quantidade de proteína liberada no sobrenadante após o rompimento das células pelo processo de recuperação proposto neste trabalho. O objetivo desta quantificação é avaliar se a ruptura das células ocorrida durante o processo de recuperação possui uma relação direta à eficiência do processo de recuperação, bem como se é influenciada pelos fatores da recuperação estudados.

Essa quantificação foi feita utilizando o método de Lowry (LOWRY, 1951). Este método consiste em adicionar os reagentes descritos abaixo à amostra que se deseja quantificar e medir a absorbância da solução resultante por espectrofotometria em 750nm.

Reagente A: (volume total 100mL)

1 mL de tartarato de sódio (Easar)

1mL de sulfato de cobre (Merck)

volume completado com carbonato de sódio a 2% (Merck) em hidróxido de sódio 0,1N (Merck)

Reagente Folin: Folin-Ciocalteu fenol (Sigma Aldrich)

A curva de calibração foi feita utilizando uma solução padrão de 1mg/mL de Albumina bovina (Baker Diagnostic Reagent) como padrão de referência.

Para cada análise, 1mL da amostra (100µL sobrenadante + 900 µL de água deionizada) foi misturada com 3,0 mL do Reagente A. Agitou-se bem e deixou-se em descanso por 1 minuto em temperatura ambiente. Após este tempo, adicionou-se 300 µL do Reagente Folin, agitou-se. Após 30 minutos de descanso, a amostra foi lida em espectrofotômetro Hitachi U-1800.

Com os dados de absorvância, esta é convertida a partir da equação 4.4.1.

$$\text{Proteína Total (mg)} = \frac{\text{absorbância em } 750\text{nm}}{0,0013} \times \frac{\text{volume da amostra}}{\text{volume de medição}} \quad (4.4.1)$$

Uma vez que esta metodologia fornece como resultado quantidade de proteína total presente no sobrenadante de cada ensaio do planejamento de experimentos, utilizou-se também o valor obtido nas análises estatísticas.

1.10.2 Determinação do teor do PHB.

As amostras da biomassa retiradas após os ensaios de recuperação foram analisadas quanto ao teor de PHB empregando-se a propanólise seguida da análise via cromatografia gasosa (GOMEZ *et al*, 1996), utilizando-se uma coluna capilar HP5, operando na faixa de 100 a 210°C, com gás hélio como gás de arraste a uma vazão de 0,8 mL/min. A metodologia empregada baseia-se na recuperação do PHB, usando dicloroetano, seguida de hidrólise e transesterificação do polihidroxibutirato (PHB), proporcionada por uma mistura de propanol e ácido clorídrico, com posterior medida do éster resultante por cromatografia gasosa. Essa análise permitiu a

verificação do nível de pureza de PHB obtido após a sua recuperação utilizando o método proposto neste trabalho.

Cada amostra de biomassa, cerca de 20mg de célula liofilizada, foi previamente submetida ao tratamento com 200µL de uma solução de ácido benzóico (40g/L) como padrão interno, 2,0mL de solução de ácido clorídrico em propanol (1:4 v/v) e 200µL de 1,2-dicloroetano. Os tubos foram fechados e agitados vigorosamente e mantidos em banho-maria por 3 horas a 100°C. Após o resfriamento, foram adicionados 4,0mL de água destilada, agitando-se novamente. A fase orgânica contendo os propil-ésteres foi injetada no cromatógrafo para quantificação e composição dos polihidroxicarboxilatos.

O ácido benzóico é empregado nesta metodologia como padrão interno, sendo adicionada quantidade conhecida do mesmo a todas as amostras, servindo para normalização dos resultados obtidos para PHB. Isto porque se tem a seguinte relação linear:

$$\frac{\text{massa de ácido benzóico} \times \text{área do pico de PHB}}{\text{área do pico de ácido benzóico}} = b \times \text{massa de PHB} + a \quad (4.3.1)$$

onde:

área do pico.....área sob o pico obtido, para cada substância analisada

(PHB ou ácido benzóico) no cromatograma obtido.

a, b.....coeficientes de regressão

Para a obtenção dos coeficientes linear e angular desta relação foi construída uma curva de calibração, empregando-se uma faixa de massa de PHB padrão. O mesmo procedimento utilizado para as amostras foi empregado para cada uma dos valores de massa de PHB padrão. Assim, com os resultados obtidos na análise cromatográfica das massa de PHB padrão, é possível estabelecer a relação apresentada na equação 4.3.1.

A partir destes coeficientes e desta relação (equação 4.3.1), são calculadas, para cada amostra, as massas de PHB presentes nas mesmas.

A concentração de PHB presente em cada amostra é então dada por:

$$PHB(\%) = \frac{\text{massa de PHB na amostra} \times 100}{\text{massa de amostra pesada}} \quad (4.3.2)$$

Como a metodologia fornece como resultado a porcentagem de PHB presente na massa de amostra liofilizada analisada, utilizou-se este valor nas análises estatísticas no planejamento de experimentos.

1.10.3 Determinação da massa molecular

As amostras da biomassa retiradas antes e após os ensaios de recuperação foram analisadas quanto à massa molecular de PHB empregando-se uma técnica desenvolvida nos Laboratórios de Biotecnologia do IPT (SILVA, 2000). Trata-se de uma metodologia de medida de massa molecular do polímero extraído do material celular de interesse, empregando-se cromatografia de permeação em gel (GPC), que se fundamenta na separação de moléculas com base no seu tamanho.

Esta técnica utiliza um cromatógrafo líquido de alta pressão (HPLC), com fase estacionária sendo copolímero de divinilbenzeno-estireno empacotado em coluna cromatográfica de permeação em gel, e fase móvel sendo clorofórmio grau HPLC a uma vazão volumétrica de 1mL/min.

A metodologia empregada baseia-se na extração do PHB com clorofórmio, cujo resultado é uma solução rica em PHB que serão preparadas para injeção no cromatógrafo. Essa análise permitiu a obtenção da massa molecular do PHB após a sua recuperação utilizando o método proposto neste trabalho.

Cada amostra de biomassa, cerca de 20mg de célula liofilizada, foi lavada com cerca de 2mL de acetona P.A. e deixados para secar. Após a secagem, adicionou-se 2mL de clorofórmio em cada frasco. Os tubos foram fechados e mantidos em agitador rotativo (150 rpm) a 37°C por 30h. Após este período, cada suspensão foi filtrada em membrana de porosidade de 0,5 µm, resistente a solventes orgânicos. A solução obtida foi colocada em placas de Petri para evaporação do clorofórmio e obtenção de um filme de PHB. A seguir, os filmes obtidos foram

dissolvidos em clorofórmio para preparo das soluções de injeção a 0,1%. O volume injetado da solução foi de 100 μL .

A calibração do equipamento foi feita utilizando-se padrões de poliestireno com massas moleculares conhecidas, e teve por finalidade estabelecer coeficientes de calibração para estimativa da massa molecular das amostras a partir de seus tempos de retenção na coluna cromatográfica. Para tal, cada uma das soluções de poliestireno de diferentes massas moleculares foi injetada no HPLC e seus tempos de retenção foram fornecidos por um programa do HPLC associado a GPC.

Na maioria das aplicações de GPC, a amostra possui moléculas com diversas massas moleculares, que juntas apresentam uma distribuição particular. Cada solução contendo polímero foi eluída da coluna, apresentando um tempo de retenção e curva de distribuição característicos. Em se tratando de padrões, a solução é homogênea, apresentando uma curva de distribuição que é praticamente um pico.

A área sobre o pico foi segmentada e, a partir das áreas destes segmentos, os dados foram processados para calcular valores que caracterizam a distribuição. Estes valores são: massa molecular ponderal média (\overline{M}_w), dependente do número e da massa das moléculas presentes na solubilização do polímero; massa molecular numérica média (\overline{M}_N), dependente do número de moléculas e índice de polidispersão (IP), dado pela razão entre \overline{M}_w e \overline{M}_N , e que define a heterogeneidade da solução em termos de massas moleculares.

A partir dos valores de massa molecular e respectivos tempos de retenção, o integrador do HPLC fez três tipos de regressão, uma linear, uma quadrática e uma cúbica, e avaliou a adequação do modelo. O melhor ajuste obtido determinou a equação cujos coeficientes foram empregados no cálculo da massa molecular das amostras a partir dos tempos de retenção.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.11 Ensaios de recuperação do PHB

Neste capítulo, serão apresentados e discutidos os ensaios realizados em tubos para centrífuga Falcon de 50mL agitados mecanicamente, utilizando diferentes concentrações de reagentes propostas neste trabalho.

Os ensaios conduzidos tiveram o objetivo de, através da metodologia de planejamento de experimentos otimizar as condições operacionais da recuperação do PHB obtido por fermentação.

Os critérios de análise dos resultados obtidos pelo planejamento de experimentos estão descritos na Figura 13.

```

Factors: 3   Blocks: none
Runs:    15

Display Order: Run Order
Display Units: Uncoded

Factors and Their Uncoded Levels

Factor Name           Low High
A   Surfactante/Biomassa  -1   1
B   EDTA/Biomassa        -1   1
C   Tempo                 -1   1

Responses and Models

Response: Proteina no sobrenadante
Terms:    A B C AA BB CC AB AC BC

Response: Pureza
Terms:    A B C AA BB CC AB AC BC
|

```

Figura 13: Critério de análise dos resultados obtidos pelo planejamento de experimentos

Cada sobrenadante retirado durante os ensaios foi submetido à análise de proteína; enquanto que cada “pellet” obtido após a sua ressuspensão em água desmineralizada foi submetido à análise de teor de polímero e massa molecular.

1.12 Tratamento estatístico após execução de experimentos

1.12.1 Proteína no sobrenadante

A dosagem de proteína de cada frasco numerado de 1 a 15 foi realizada pelo método Lowry (LOWRY, 1951).

Após realizada esta análise, os resultados obtidos foram introduzidos na planilha da Figura 10 e são mostrados na Figura 14. Estes resultados foram analisados segundo análise residual, análise de variância (ANOVA) e as superfícies de contorno.

↓	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
	StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	Surfactante/Biomassa	EDTA/Biomassa	Tempo	Teor de PHB	MW	Proteína no sobrenadante
1	10	1	2	1	0	1	-1			85.050
2	7	2	2	1	-1	0	1			93.825
3	3	3	2	1	-1	1	0			96.750
4	8	4	2	1	1	0	1			72.225
5	15	5	0	1	0	0	0			101.025
6	1	6	2	1	-1	-1	0			80.325
7	9	7	2	1	0	-1	-1			75.825
8	11	8	2	1	0	-1	1			94.050
9	2	9	2	1	1	-1	0			91.800
10	5	10	2	1	-1	0	-1			92.250
11	13	11	0	1	0	0	0			103.275
12	6	12	2	1	1	0	-1			101.475
13	14	13	0	1	0	0	0			91.125
14	12	14	2	1	0	1	1			119.925
15	4	15	2	1	1	1	0			109.800

Figura 14: Resultados obtidos na análise de proteína no sobrenadante para os 15 ensaios realizados (Coluna C10).

Com o intuito de identificar possíveis erros sistemáticos, foram analisados os gráficos de Análise Residual (erros) da Figura 15:

Análise Normal: Os pontos obtidos neste gráfico indicam que os resíduos estão normalmente distribuídos por formarem uma linha reta.

Resíduos versus Valores Ajustados: Os pontos obtidos neste gráfico indicam que não existem *outliers* (pontos fora da curva) por estarem randomicamente distribuídos. E também por não estarem distribuídos de maneira organizada, não existe a indicação de existência de um erro sistêmico, isto é, não inerente ao método utilizado.

Histograma: Pela maneira como os dados estão distribuídos, isto indica que o modelo de distribuição normal está adequado ao modelo, isto é, os resíduos não estão distribuídos de maneira tendenciosa.

Resíduos versus Ordem de Observação: Por estarem distribuídos de maneira randômica, os resíduos não apresentam um erro sistemático.

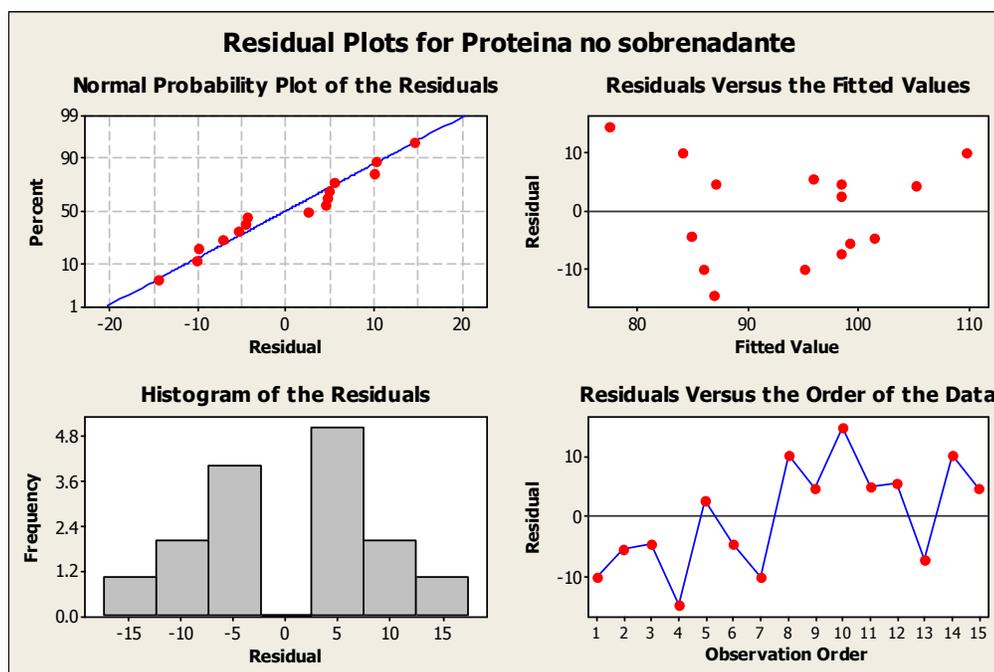


Figura 15: Gráficos que representam análises residuais dos valores obtidos no planejamento. Da esquerda para a direita e de cima para baixo temos os gráficos de Análise Normal, Resíduos versus Valores Ajustados, Histograma e Resíduos versus Ordem de Observação.

Buscando identificar a importância de cada fator perante a resposta de proteína no sobrenadante, os coeficientes de regressão e a análise de variância (ANOVA) foram analisados. (Figura 16).

Nos modelos quadráticos de superfície de resposta, como o utilizado neste estudo, o valor de P para a linha *Lack of Fit* na tabela de Análise de Variância $P = 0,115$ ($P > 0.05$) sugere que este modelo é adequado para os dados obtidos.

Ainda também na Figura 16, a primeira tabela fornece os coeficientes de regressão de cada termo do modelo. Por se tratar de um planejamento ortogonal, o efeito de cada fator é estimado separadamente. Os valores de P sugerem a

importância de cada fator (termos quadráticos) ou de cada interação entre fatores. Um baixo valor de P, geralmente menor que 0.05 indica que aquele fator ou interação é importante para a propriedade estudada. Portanto, considerando a propriedade de Proteína no Sobrenadante, nenhum dos fatores parece influenciar de maneira significativa os valores de Proteína obtidos no sobrenadante.

Estimated Regression Coefficients for Proteina no sobrenadante

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	98.4750	8.444	11.663	0.000
Surfactante/Biomassa	1.5187	5.171	0.294	0.781
EDTA/Biomassa	8.6906	5.171	1.681	0.154
Tempo	3.1781	5.171	0.615	0.566
Surfactante/Biomassa* Surfactante/Biomassa	-3.7875	7.611	-0.498	0.640
EDTA/Biomassa*EDTA/Biomassa	-0.0187	7.611	-0.002	0.998
Tempo*Tempo	-4.7438	7.611	-0.623	0.560
Surfactante/Biomassa*EDTA/Biomassa	0.3937	7.312	0.054	0.959
Surfactante/Biomassa*Tempo	-7.7063	7.312	-1.054	0.340
EDTA/Biomassa*Tempo	4.1625	7.312	0.569	0.594

S = 14.62 R-Sq = 51.6% R-Sq(adj) = 0.0%

Analysis of Variance for Proteina no sobrenadante

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	1138.84	1138.84	126.54	0.59	0.767
Linear	3	703.47	703.47	234.49	1.10	0.432
Square	3	127.90	127.90	42.63	0.20	0.893
Interaction	3	307.47	307.47	102.49	0.48	0.711
Residual Error	5	1069.40	1069.40	213.88		
Lack-of-Fit	3	985.83	985.83	328.61	7.86	0.115
Pure Error	2	83.57	83.57	41.78		
Total	14	2208.24				

Obs	StdOrder	Proteina no sobrenadante	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
1	1	85.050	95.063	12.665	-10.012	-1.37
2	2	93.825	99.309	12.665	-5.484	-0.75
3	3	96.750	101.447	12.665	-4.697	-0.64
4	4	72.225	86.934	12.665	-14.709	-2.01 R
5	5	101.025	98.475	8.444	2.550	0.21
6	6	80.325	84.853	12.665	-4.528	-0.62
7	7	75.825	86.006	12.665	-10.181	-1.39
8	8	94.050	84.038	12.665	10.012	1.37
9	9	91.800	87.103	12.665	4.697	0.64
10	10	92.250	77.541	12.665	14.709	2.01 R
11	11	103.275	98.475	8.444	4.800	0.40
12	12	101.475	95.991	12.665	5.484	0.75
13	13	91.125	98.475	8.444	-7.350	-0.62
14	14	119.925	109.744	12.665	10.181	1.39
15	15	109.800	105.272	12.665	4.528	0.62

R denotes an observation with a large standardized residual.

Figura 16: Resultados dos coeficientes de regressão e Análise de Variância (ANOVA). Em destaque, estão os valores utilizados para análise e interpretação dos resultados.

O termo $S = 14,62$ indica também que a variabilidade das medidas devido a erros é de cerca de 6%. Isto porque, como o respectivo artigo indica (LOWRY, 1951), o erro do método deve ser levado em consideração ao se analisar os resultados obtidos quando se trabalha com algum componente que possa interferir no método. Neste estudo, existe a possibilidade de alguma interferência causada pela betaína por outro reagente do método, ocasionando medidas de absorvância inexatas.

1.12.2 Teor de PHB

O teor de PHB de cada frasco numerado de 1 a 15 foi analisado pelo método de propanólise seguida da análise via cromatografia gasosa (GOMEZ *et al*, 1996).

Depois de realizada esta análise, os resultados obtidos estão apresentados na planilha da Figura 10 e são mostrados na Figura 19. Estes resultados foram analisados segundo análise residual, análise de variância (ANOVA) e as superfícies de contorno.

↓	C1	C2	C3	C4	C5		C6	C7	C8	C9	C10
	StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	Surfactante/Biomassa	EDTA/Biomassa	Tempo	Teor de PHB	MW	Proteína no sobrenadante	
1	10	1	2	1	0	1	-1	93.87		85.050	
2	7	2	2	1	-1	0	1	88.83		93.825	
3	3	3	2	1	-1	1	0	90.65		96.750	
4	8	4	2	1	1	0	1	95.96		72.225	
5	15	5	0	1	0	0	0	94.72		101.025	
6	1	6	2	1	-1	-1	0	87.27		80.325	
7	9	7	2	1	0	-1	-1	93.20		75.825	
8	11	8	2	1	0	-1	1	93.17		94.050	
9	2	9	2	1	1	-1	0	95.04		91.800	
10	5	10	2	1	-1	0	-1	90.90		92.250	
11	13	11	0	1	0	0	0	93.74		103.275	
12	6	12	2	1	1	0	-1	94.78		101.475	
13	14	13	0	1	0	0	0	92.74		91.125	
14	12	14	2	1	0	1	1	92.07		119.925	
15	4	15	2	1	1	1	0	93.33		109.800	

Figura 19: Resultados obtidos na análise do teor de PHB para os 15 ensaios realizados (Coluna C8).

Com o intuito de identificar possíveis erros sistemáticos, foram analisados os gráficos de Análise Residual (erros) da Figura 20:

Análise Normal: Os pontos obtidos neste gráfico indicam que os resíduos estão normalmente distribuídos por formarem uma linha reta.

Resíduos versus Valores Ajustados: Os pontos obtidos neste gráfico indicam que não existem *outliers* (pontos fora da curva) por estarem randomicamente distribuídos. E também por não estarem distribuídos de maneira organizada, não existe a indicação de existência de um erro sistêmico, isto é, não inerente ao método utilizado.

Histograma: Pela maneira como os dados estão distribuídos, isto indica que o modelo de distribuição normal está adequado ao modelo, isto é, os resíduos não estão distribuídos de maneira tendenciosa.

Resíduos versus Ordem de Observação: Por estarem distribuídos de maneira randômica, os resíduos não apresentam um erro sistemático.

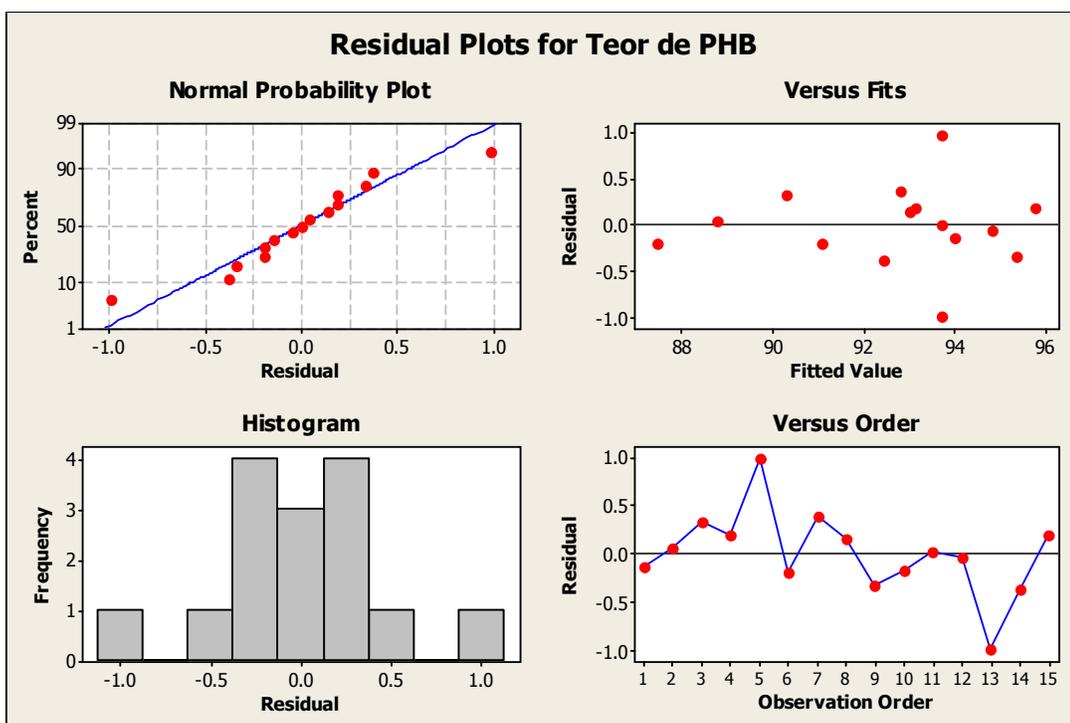


Figura 20: Gráficos que representam análises residuais dos valores obtidos no planejamento. Da esquerda para a direita e de cima para baixo temos os gráficos de Análise Normal, Resíduos versus Valores Ajustados, Histograma e Resíduos versus Ordem de Observação.

Buscando identificar a importância de cada fator perante a resposta de teor de PHB (%), os coeficientes de regressão e a análise de variância (ANOVA) foram analisados. (Figura 21).

Nos modelos quadráticos de superfície de resposta, como o utilizado neste estudo, o valor de P para a linha *Lack of Fit* na tabela de Análise de Variância P = 0.865 ($P > 0.05$) sugere que este modelo é adequado para os dados obtidos.

Estimated Regression Coefficients for Teor de PHB

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	93.7333	0.4212	222.538	0.000
Surfactante/Biomassa	2.6825	0.2579	10.400	0.000
EDTA/Biomassa	0.1550	0.2579	0.601	0.574
Tempo	-0.3400	0.2579	-1.318	0.245
Surfactante/Biomassa*	-1.3104	0.3797	-3.451	0.018
Surfactante/Biomassa				
EDTA/Biomassa*EDTA/Biomassa	-0.8504	0.3797	-2.240	0.075
Tempo*Tempo	0.1946	0.3797	0.513	0.630
Surfactante/Biomassa*EDTA/Biomassa	-1.2725	0.3648	-3.488	0.017
Surfactante/Biomassa*Tempo	0.8125	0.3648	2.227	0.076
EDTA/Biomassa*Tempo	-0.4425	0.3648	-1.213	0.279

S = 0.7295 R-Sq = 96.7% R-Sq(adj) = 90.7%

Analysis of Variance for Teor de PHB

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	77.4664	77.4664	8.6074	16.17	0.003
Linear	3	58.6834	58.6834	19.5611	36.75	0.001
Square	3	8.8821	8.8821	2.9607	5.56	0.047
Interaction	3	9.9009	9.9009	3.3003	6.20	0.039
Residual Error	5	2.6612	2.6612	0.5322		
Lack-of-Fit	3	0.7009	0.7009	0.2336	0.24	0.865
Pure Error	2	1.9603	1.9603	0.9801		
Total	14	80.1276				

Obs	StdOrder	Pureza	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
1	1	93.870	94.015	0.632	-0.145	-0.40
2	2	88.830	88.783	0.632	0.047	0.13
3	3	90.650	90.318	0.632	0.332	0.91
4	4	95.960	95.773	0.632	0.187	0.51
5	5	94.720	93.733	0.421	0.987	1.66
6	6	87.270	87.463	0.632	-0.192	-0.53
7	7	93.200	92.820	0.632	0.380	1.04
8	8	93.170	93.025	0.632	0.145	0.40
9	9	95.040	95.373	0.632	-0.333	-0.91
10	10	90.900	91.088	0.632	-0.188	-0.51
11	11	93.740	93.733	0.421	0.007	0.01
12	12	94.780	94.828	0.632	-0.048	-0.13
13	13	92.740	93.733	0.421	-0.993	-1.67
14	14	92.070	92.450	0.632	-0.380	-1.04
15	15	93.330	93.138	0.632	0.192	0.53

Figura 21: Resultados dos coeficientes de regressão e Análise de Variância (ANOVA). Em destaque, estão os valores utilizados para análise e interpretação dos resultados.

Ainda também na Figura 21, a primeira tabela fornece os coeficientes de regressão de cada termo do modelo. Por se tratar de um planejamento ortogonal, o efeito de cada fator é estimado separadamente. Os valores de P sugerem a importância de cada fator (termos quadráticos) ou de cada interação entre fatores. O

fator (Surfactante/Biomassa) ($P=0$) e as interações (Surfactante/Biomassa)² ($P=0.018$) e (Surfactante/Biomassa) X (EDTA/Biomassa) ($P=0.017$) são os fatores que influenciam de maneira mais significativa a obtenção de um alto teor de PHB.

Isto significa que a obtenção de um teor elevado de PHB é influenciada positivamente pela presença do surfactante e do EDTA.

Levando em consideração o possível mecanismo de ação do surfactante na ruptura das células, a baixas concentrações, as moléculas do surfactante são incorporadas na camada lipídica da membrana celular externa. Com o aumento desta concentração, mais moléculas são incorporadas na membrana, aumentando o volume celular. Uma vez saturada, a adição de mais moléculas no sistema causa a ruptura da estrutura envolta em surfactante e são formadas grandes moléculas de surfactante e fosfolipídios. Isto faz com que o PHB seja extraído para a solução cercada por debris celular. Outra possível função do surfactante é a solubilização. Ele solubiliza não apenas proteínas, mas também outros NPCM (Non-PHB Cell Material) (BIERMANN, 1987), o que pode justificar o aumento do teor de PHB.

O papel do EDTA pode ser explicado pelo fato da bactéria *Cupriavidus necator* ser Gram-negativa contendo lipopolisacarídeos, proteínas e cátions bivalentes como Ca^{+2} e Mg^{+2} na membrana celular externa. A adição de EDTA pode desestabilizar a membrana externa formando complexos com os cátions bivalentes. Estas alterações na membrana externa enfraquecem a membrana interna, o que torna a ruptura da *Cupriavidus necator* mais fácil e permite a recuperação de um alto teor de PHB. Porém, sua presença pode competir com o surfactante

O termo $S= 0.7295$ indica também que a variabilidade das medidas devido a erros é de menos de 1%, isto é, que a obtenção das medidas foi muito pouco influenciada por erros, indicando também adequação do método de propanólise seguida da análise via cromatografia gasosa (GOMEZ *et al*, 1996) para obtenção do teor de PHB.

As Figuras 22 a 24 em verde escuro a região onde há maior teor de PHB; tempo (s) vs razão surfactante/biomassa, isto é, a indicação de maior extração de PHB nesta região. E assim em diversos tons de verde têm-se as faixas que representam cada porcentagem de teor de PHB extraído.

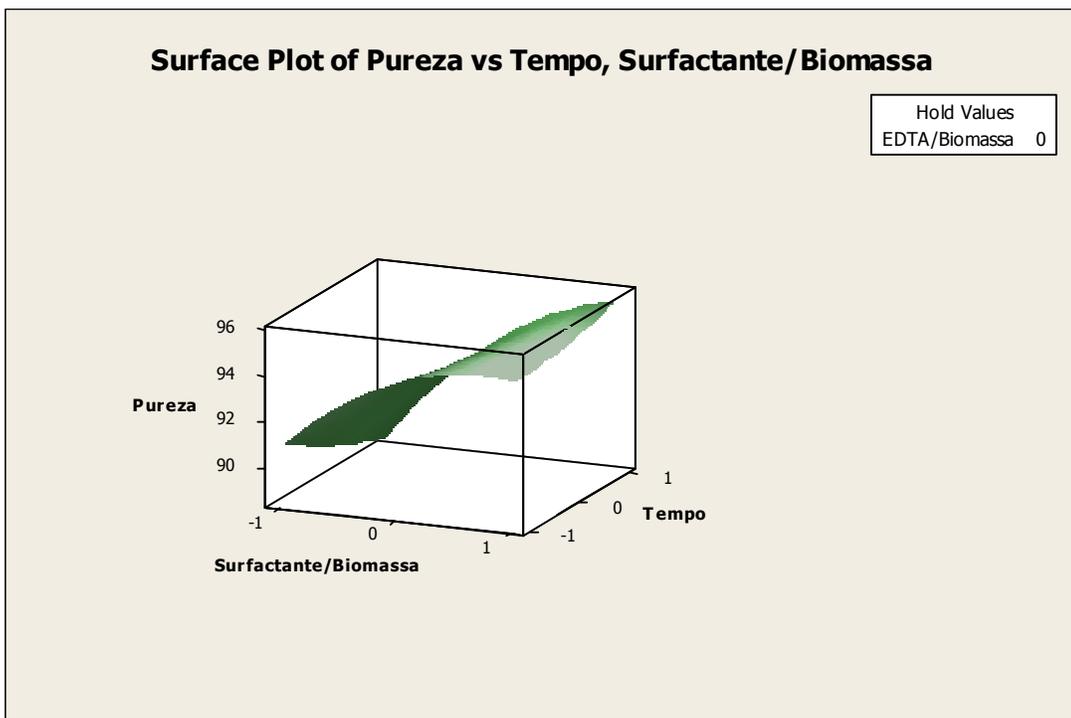
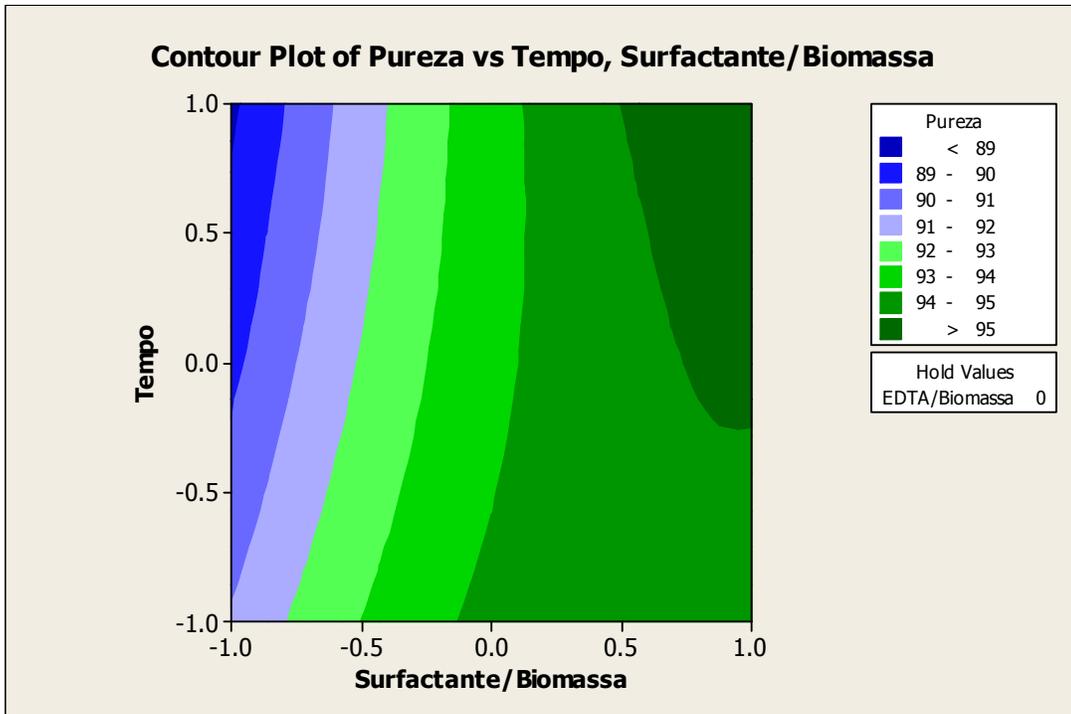


Figura 22: Contorno em 2D e 3D da quantidade de proteína total no sobrenadante (mg) considerando os fatores tempo (s) e razão surfactante/biomassa.

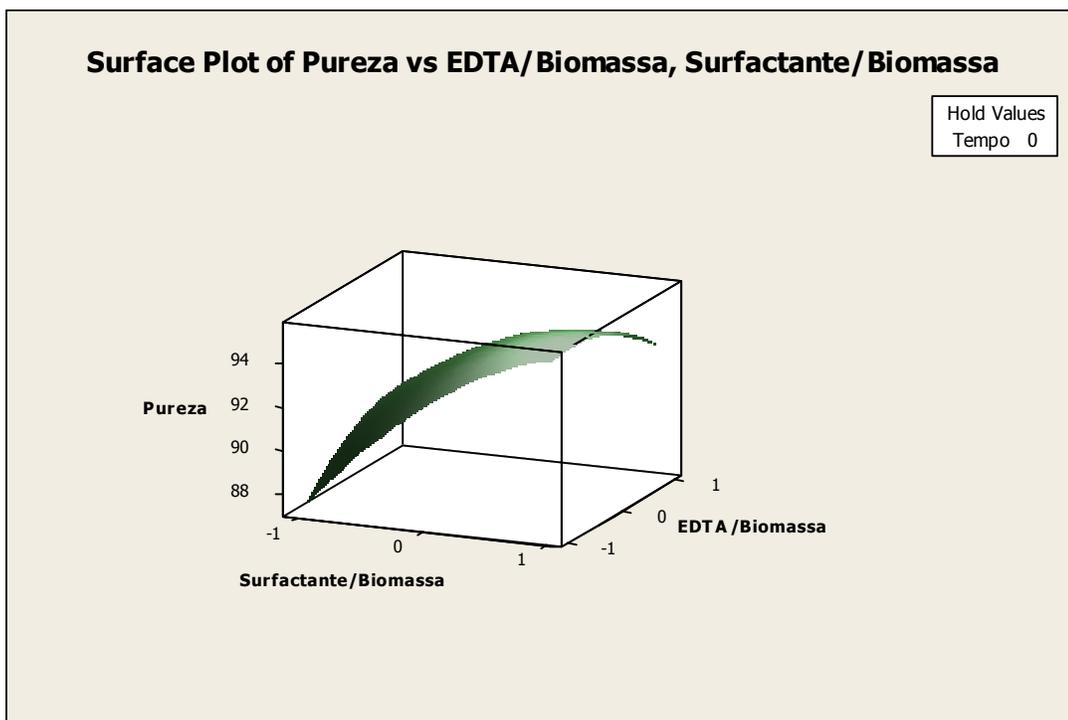
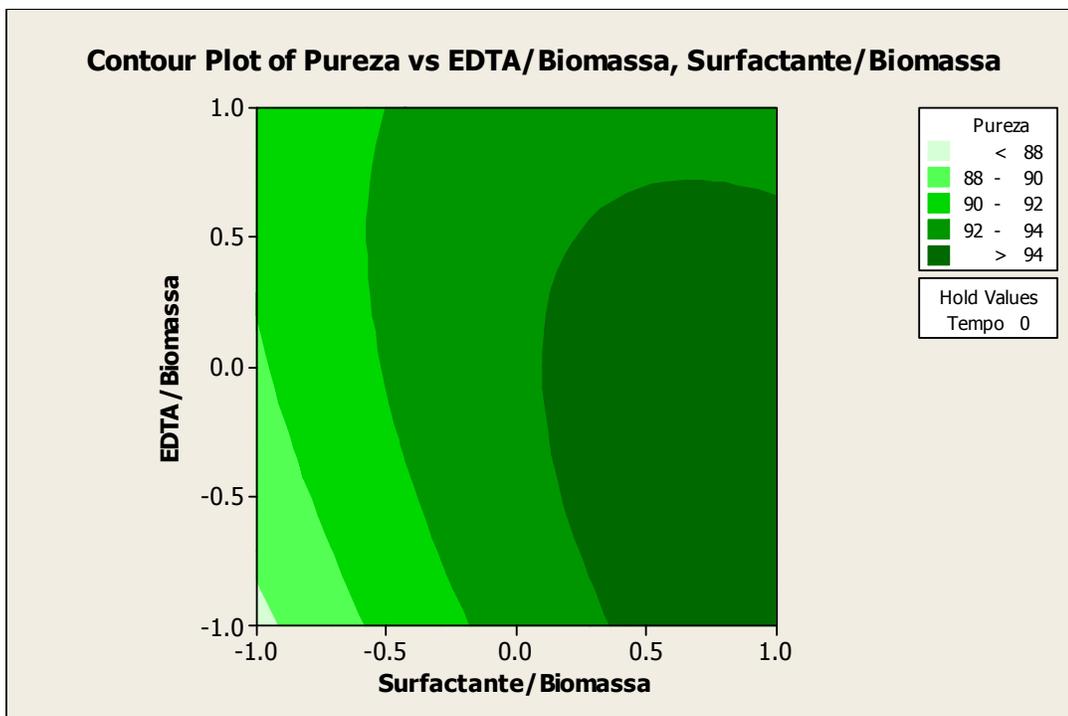


Figura 23: Contorno em 2D e 3D do teor de PHB (%) considerando os fatores razão EDTA/biomassa e razão surfactante/biomassa.

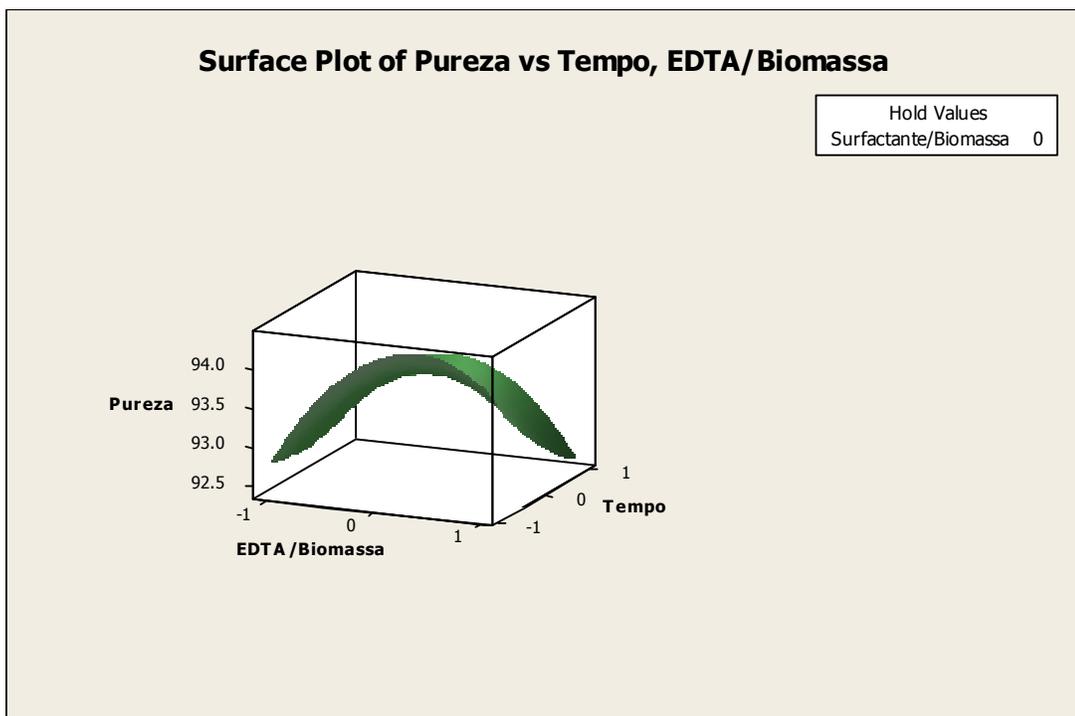
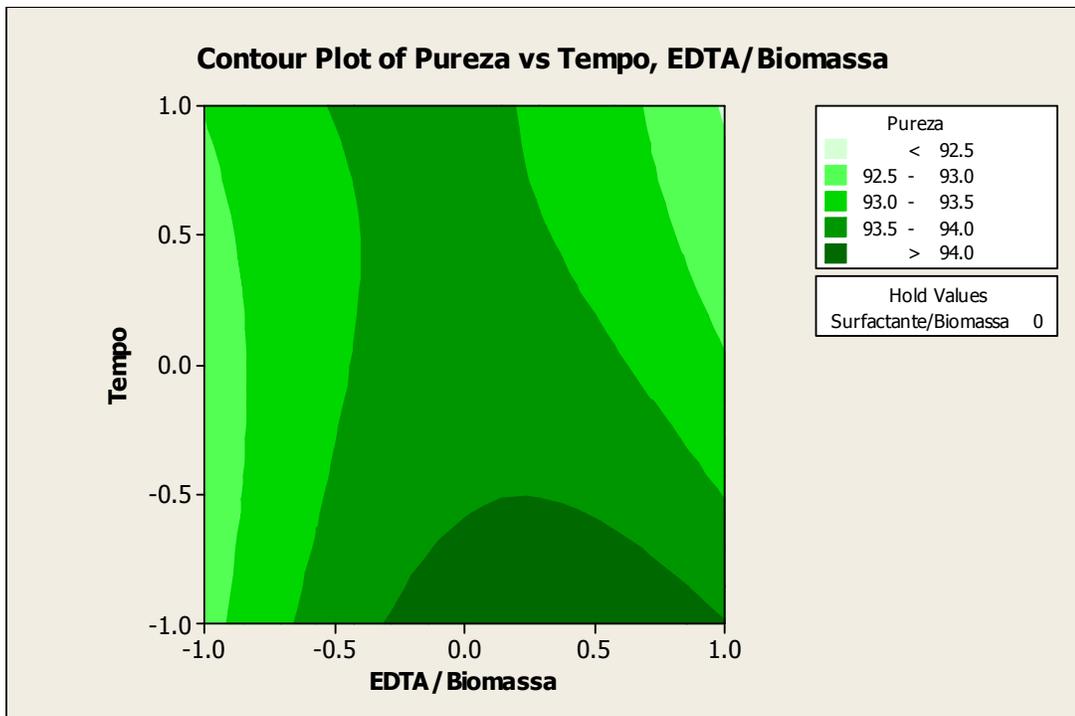


Figura 24: Contorno em 2D e 3D do teor de PHB (%) considerando os fatores tempo(s) e razão surfactante/biomassa.

Ao interpolarmos as superfícies dos três fatores, é possível identificar uma condição para os 3 fatores na qual existe a indicação de maior recuperação de PHB. (Figura 25).

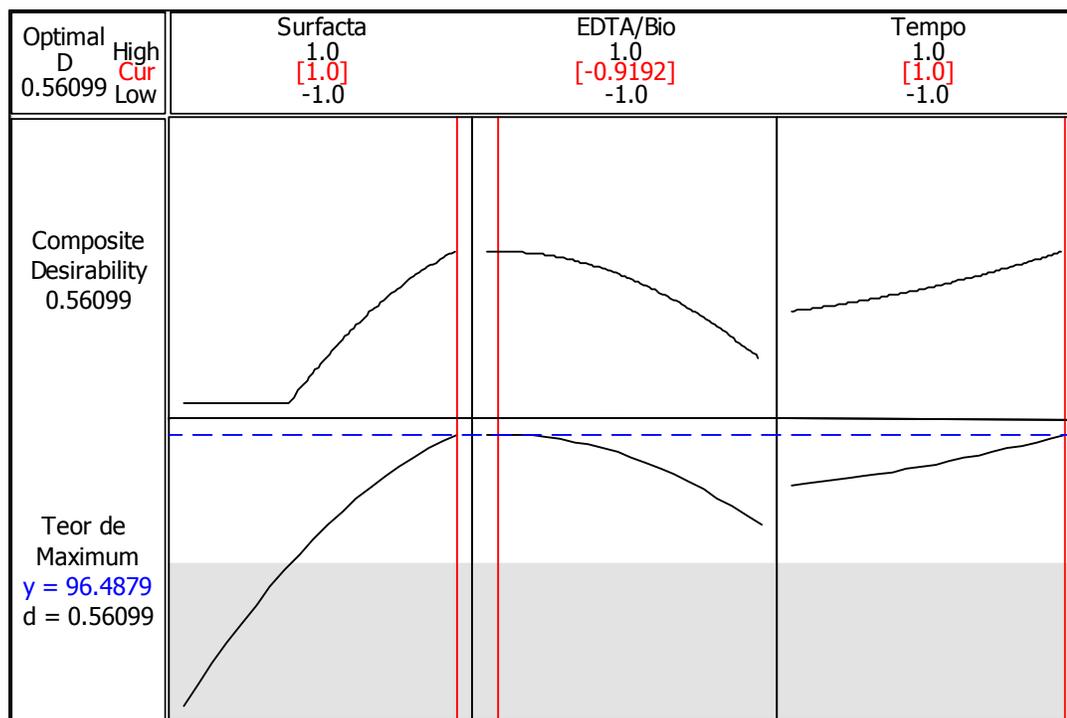


Figura 25: Condição otimizada para obtenção da maior recuperação de PHB para os 3 fatores tempo, surfactante/biomassa e EDTA/biomassa.

Analisando a Figura 25, a coluna da extrema esquerda informa em y o máximo teor de PHB que pode ser extraído pelo sistema: $y=96.4879\%$, segundo o modelo estatístico ajustado. Na parte superior, têm-se os valores dos níveis dos fatores nos quais se obtém o maior máximo teor de PHB extraído. E na parte central encontram-se os gráficos que descrevem o comportamento de cada fator na obtenção do máximo teor de PHB.

Ao comparar o valor obtido de teor de PHB neste estudo de 96,5% com os valores encontrados em publicações de diversas metodologias de recuperação de PHB (JACQUEL *et al*, 2008), valores de pureza acima de 95% são considerados métodos eficientes de recuperação. Este resultado mostra que o método proposto

neste estudo permite a recuperação do PHB de maneira eficiente e com pureza acima do nível desejado.

1.12.3 Massa Molecular

As medidas de massa molecular de cada frasco numerado de 1 a 15 foram realizadas segundo o método descrito no item 4.3.3 deste trabalho. O objetivo desta análise foi avaliar a massa molecular do PHB obtido após o processo de recuperação e compará-lo à massa molecular do PHB antes do processo. Isto porque um dos problemas apresentados pela maioria dos métodos de purificação dos polímeros biodegradáveis de origem bacteriana é a redução da massa molecular dos mesmos durante o referido processo, principalmente devido ao uso de métodos agressivos de recuperação.

Depois de realizada esta análise, os resultados obtidos foram introduzidos na planilha da Figura 10 e são mostrados na Figura 26. Estes resultados foram analisados segundo análise residual, análise de variância (ANOVA) e as superfícies de contorno.

↓	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
	StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	Surfactante/Biomassa	EDTA/Biomassa	Tempo	Teor de PHB	MW	Proteína no sobrenadante
1	10	1	2	1	0	1	-1	93.87	377258	85.050
2	7	2	2	1	-1	0	1	88.83	370674	93.825
3	3	3	2	1	-1	1	0	90.65	348937	96.750
4	8	4	2	1	1	0	1	95.96	270272	72.225
5	15	5	0	1	0	0	0	94.72	321530	101.025
6	1	6	2	1	-1	-1	0	87.27	364810	80.325
7	9	7	2	1	0	-1	-1	93.20	250479	75.825
8	11	8	2	1	0	-1	1	93.17	377830	94.050
9	2	9	2	1	1	-1	0	95.04	259091	91.800
10	5	10	2	1	-1	0	-1	90.90	424106	92.250
11	13	11	0	1	0	0	0	93.74	248814	103.275
12	6	12	2	1	1	0	-1	94.78	381207	101.475
13	14	13	0	1	0	0	0	92.74	305945	91.125
14	12	14	2	1	0	1	1	92.07	347761	119.925
15	4	15	2	1	1	1	0	93.33	386454	109.800

Figura 26: Resultados obtidos na análise de massa molecular (Mw) para os 15 ensaios realizados (Coluna C9).

Com o intuito de identificar possíveis erros sistemáticos, foram analisados os gráficos de Análise Residual (erros) da Figura 27:

Análise Normal: Os pontos obtidos neste gráfico indicam que os resíduos estão normalmente distribuídos por formarem uma linha reta.

Resíduos versus Valores Ajustados: Os pontos obtidos neste gráfico indicam que não existem *outliers* (pontos fora da curva) por estarem

randomicamente distribuídos. E também por não estarem distribuídos de maneira organizada, não existe a indicação de existência de um erro sistemático, isto é, não inerente ao método utilizado.

Histograma: Pela maneira como os dados estão distribuídos, isto indica que o modelo de distribuição normal está adequado ao modelo, isto é, os resíduos não estão distribuídos de maneira tendenciosa.

Resíduos versus Ordem de Observação: Por estarem distribuídos de maneira randômica, os resíduos não apresentam um erro sistemático.

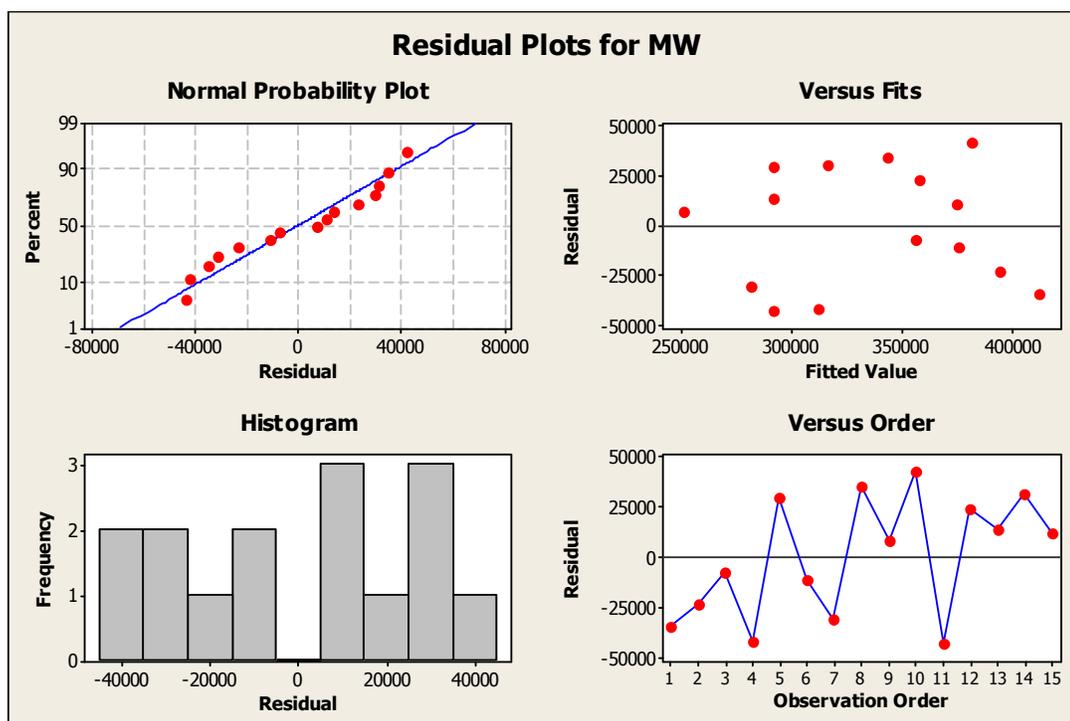


Figura 27: Gráficos que representam análises residuais dos valores obtidos no planejamento. Da esquerda para a direita e de cima para baixo temos os gráficos de Análise Normal, Resíduos versus Valores Ajustados, Histograma e Resíduos versus Ordem de Observação.

Buscando identificar a importância de cada fator perante a resposta de massa molecular (Mw), os coeficientes de regressão e a análise de variância (ANOVA) foram analisados. (Figura 28).

Nos modelos quadráticos de superfície de resposta, como o utilizado neste estudo, o valor de P para a linha *Lack of Fit* na tabela de Análise de Variância $P = 0.335$ ($P > 0.05$) sugere que este modelo é adequado para os dados obtidos.

Estimated Regression Coefficients for Mw

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	292096	28588	10.218	0.000
Surfactante/Biomassa	-26438	17506	-1.510	0.191
EDTA/Biomassa	26025	17506	1.487	0.197
Tempo	-8314	17506	-0.475	0.655
Surfactante/Biomassa*	35480	25769	1.377	0.227
Surfactante/Biomassa				
EDTA/Biomassa*EDTA/Biomassa	12247	25769	0.475	0.655
Tempo*Tempo	33989	25769	1.319	0.244
Surfactante/Biomassa*EDTA/Biomassa	35809	24758	1.446	0.208
Surfactante/Biomassa*Tempo	-14376	24758	-0.581	0.587
EDTA/Biomassa*Tempo	-39212	24758	-1.584	0.174

S = 49515.2 R-Sq = 72.39% R-Sq(adj) = 22.70%

Analysis of Variance for Mw

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	9	32144681999	32144681999	3571631333	1.46	0.354
Linear	3	11563092272	11563092272	3854364091	1.57	0.307
Square	3	8475479274	8475479274	2825159758	1.15	0.414
Interaction	3	12106110452	12106110452	4035370151	1.65	0.292
Residual Error	5	12258756811	12258756811	2451751362		
Lack-of-Fit	3	9327270130	9327270130	3109090043	2.12	0.336
Pure Error	2	2931486681	2931486681	1465743340		
Total	14	44403438810				

Obs	StdOrder	MW	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
1	1	377258.000	411883.125	42881.389	-34625.125	-1.40
2	2	370674.000	394064.250	42881.389	-23390.250	-0.94
3	3	348937.000	356476.875	42881.389	-7539.875	-0.30
4	4	270272.000	312437.000	42881.389	-42165.000	-1.70
5	5	321530.000	292096.333	28587.593	29433.667	0.73
6	6	364810.000	376044.875	42881.389	-11234.875	-0.45
7	7	250479.000	281409.125	42881.389	-30930.125	-1.25
8	8	377830.000	343204.875	42881.389	34625.125	1.40
9	9	259091.000	251551.125	42881.389	7539.875	0.30
10	10	424106.000	381941.000	42881.389	42165.000	1.70
11	11	248814.000	292096.333	28587.593	-43282.333	-1.07
12	12	381207.000	357816.750	42881.389	23390.250	0.94
13	13	305945.000	292096.333	28587.593	13848.667	0.34
14	14	347761.000	316830.875	42881.389	30930.125	1.25
15	15	386454.000	375219.125	42881.389	11234.875	0.45

Figura 28: Resultados dos coeficientes de regressão e Análise de Variância (ANOVA). Em destaque, estão os valores utilizados para análise e interpretação dos resultados

Ainda na Figura 28, a primeira tabela fornece os coeficientes de regressão de cada termo do modelo. Utilizando o mesmo critério de análise usado anteriormente, os valores de P de cada fator obtidos na análise de massa molecular do PHB foram analisados quanto a sua importância, e nenhum dos fatores parece influenciar de

maneira significativa no aumento ou diminuição da massa molecular do PHB, possivelmente por estar diretamente relacionada à capacidade e especificidade do método em minimizar danos à cadeia polimérica e focar na ruptura da parede celular.

O termo $S = 49515,2$ indica também que a variabilidade das medidas devido a erros é de cerca de 15%, isto é, variabilidade que segundo o método empregando cromatografia de permeação em gel (GPC) (SILVA, 2000) pode ser considerada dentro dos níveis padrão.

O valor de massa molecular de um polímero está diretamente associado ao tipo de processo fermentativo usado na sua produção e o processo de recuperação utilizado na sua obtenção. Sua importância como fator de avaliação da adequação de um polímero para uma determinada aplicação está no fato de a massa molecular influenciar diretamente a processabilidade e as propriedades físicas e mecânicas deste polímero. Uma elevada massa molecular permite a utilização do polímero em aplicações mais severas; porém, torna seu processamento mais dificultoso.

Baseando-se nos valores de massa molecular dos principais PHAs comerciais atualmente (JACQUEL *et al*, 2008), a faixa da massa molecular considerada adequada para sua ampla utilização, seja como homopolímero ou em blendas poliméricas é de 250000 a 600000 Da. Assim, o resultado de massa molecular obtido neste estudo evidencia a eficiência do método de purificação proposto na produção de PHB com massa molecular adequadamente elevada para um amplo uso.

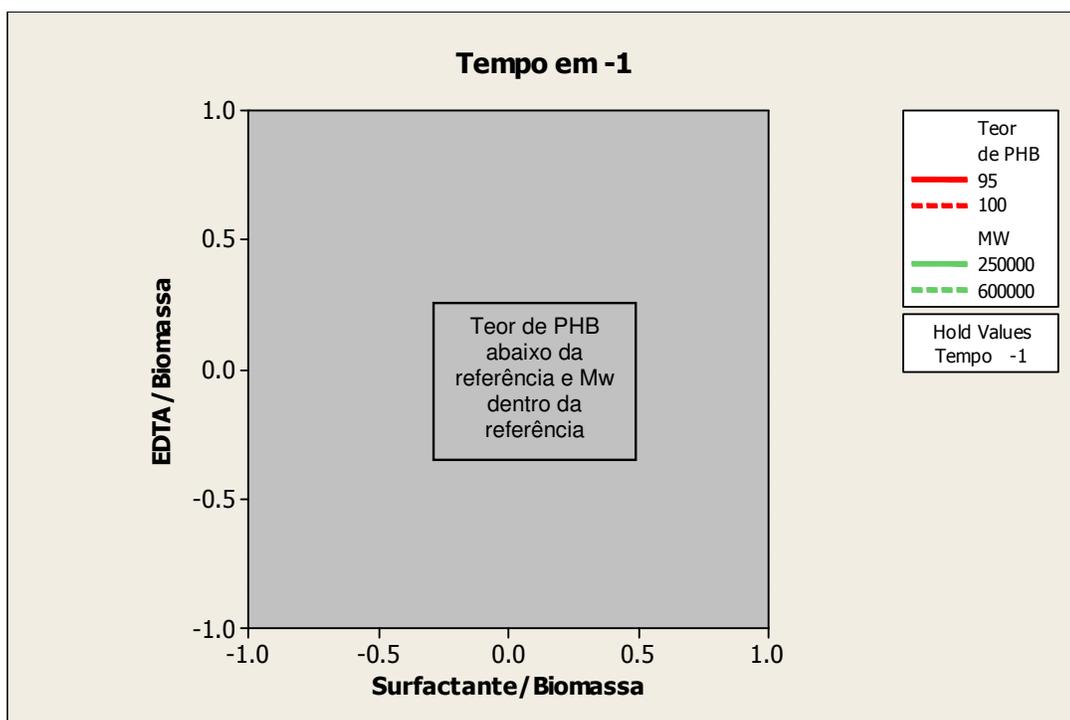
1.12.4 Análise da condição otimizada

As análises das influências de cada fator estudado no método de recuperação proposto até agora buscaram, em separado, a obtenção do maior teor de PHB e elevada massa molecular. Porém, para que a metodologia proposta seja otimizada e adequada para a recuperação de um polímero de amplo uso é necessário que se obtenha a melhor condição de operação dos fatores da metodologia considerando estas duas propriedades.

Para isso, interpolaram-se os resultados obtidos das análises de teor de PHB e massa molecular, buscando a condição onde se obtenha um polímero de ampla utilização, seja como homopolímero, copolímero ou em blendas poliméricas, ou seja,

teor de PHB acima de 95% e massa molecular acima de 250000 Da. (faixa de referência)

A Figura 29 mostra a interpolação dos 3 fatores ao mesmo tempo, sobrepondo os gráficos 2D de teor de PHB e massa molecular, considerando o fator Tempo nas condições representados pelos níveis -1, 0 e 1, conforme codificação mencionada na Tabela 5. A região branca dos gráficos representa a região onde ambas as propriedades teor de PHB e massa molecular estão na faixa designada como referência. Já as regiões em cinza representam a região onde uma ou ambas as propriedades estão fora da faixa ideal.



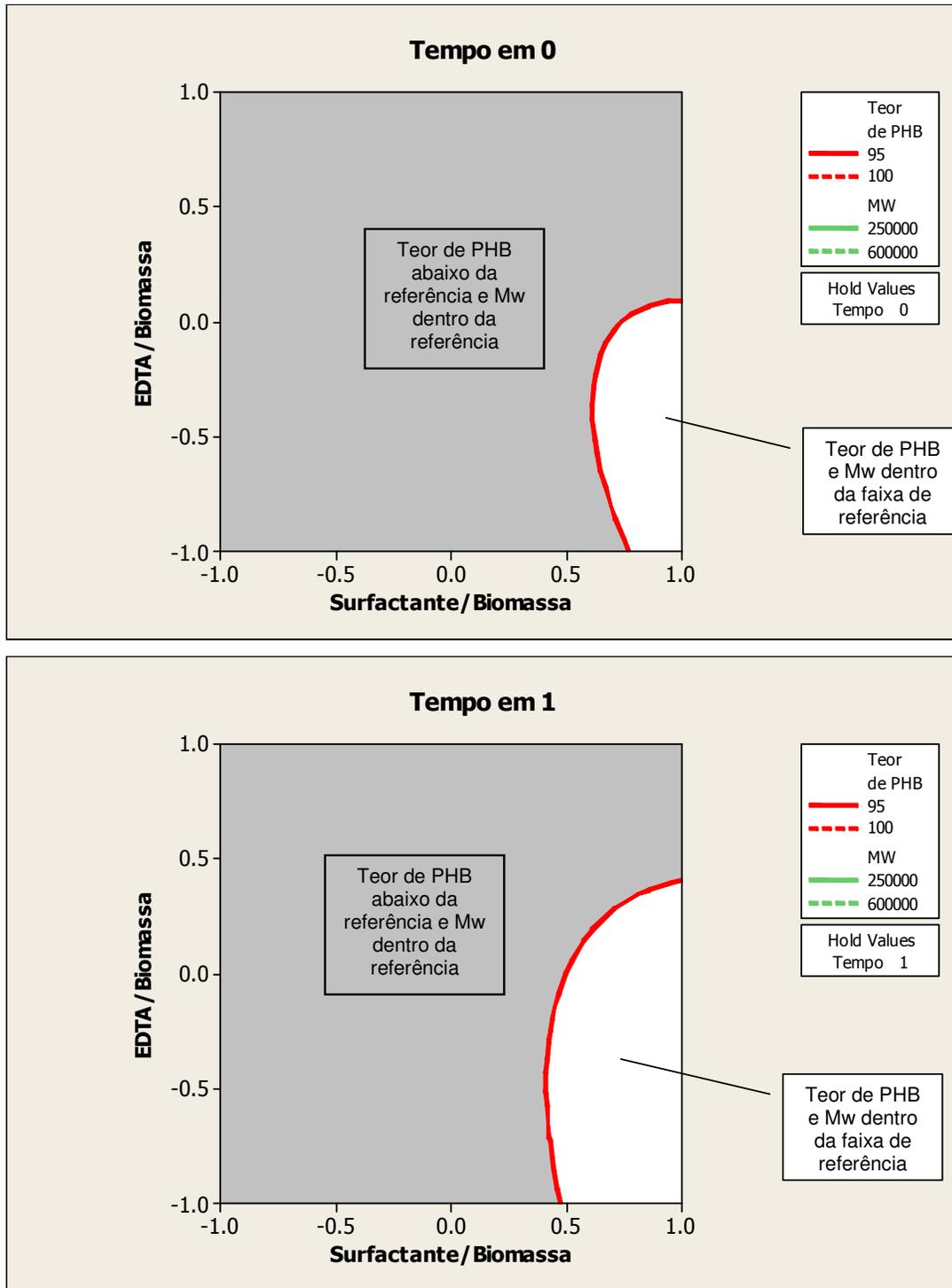


Figura 29: Contorno em 2D dos fatores teor de PHB e a massa molecular, considerando o fator Tempo nos níveis -1, 0 e 1,

Baseando-se nos resultados obtidos até então, buscou-se obter a condição de cada fator estudado, tempo, EDTA e surfactante para se obter uma resposta única que gerasse o máximo teor de PHB (acima de 95%) e massa molecular entre 250000 e 600000 Da. Para isso, foram estipulados pesos de importância para as duas propriedades, uma vez que a pureza do polímero é o principal fator que determina o valor econômico do material.

A Figura 30 mostra como os fatores afetam as respostas previstas pelo modelo estatístico ajustado para este estudo. Cada coluna do gráfico corresponde a um fator. A linha superior do gráfico corresponde a significância composta (D), e as demais linhas correspondem as propriedades estudadas. As células do gráfico mostram como as respostas correspondentes ou as significâncias individuais variam em função de um dos fatores, enquanto os demais são fixados. Os números descritos no topo da coluna mostram os níveis dos fatores, sendo que em vermelho o nível cuja resposta é a otimização desejada das propriedades. As linhas vermelhas verticais representam o ajuste do fator correspondente. As linhas horizontais azuis correspondem aos valores das respostas das propriedades. As regiões em cinza indicam que os ajustes dos fatores nesta região correspondem a respostas das propriedades com significância zero.

Os valores D (significância composta) e d (significância individual) são valores usados para analisar quão bem a combinação das variáveis satisfazem a meta desejada para as respostas das propriedades. A significância individual (d) avalia quão bem os ajustes otimizam uma única resposta; já a significância composta (D) avalia quão bem os ajustes otimizam um conjunto de respostas, e é calculada pela média geométrica ponderada das significância individuais. Os valores de significância vão de zero a um; um representa o caso ideal; e zero indica que uma ou mais respostas estão fora dos limites estabelecidos.

O valor de $D = 0,11771$ indica que os ajustes parecem resultar em condições favoráveis para as duas propriedades como um todo. Entretanto, a significância individual indica que os ajustes são mais efetivos em maximizar a massa molecular ($d = 0,20796$) que maximizar o teor de PHB ($d = 0,08856$). Isso é, o método proposto tem maior êxito em otimizar a massa molecular que o teor de PHB.

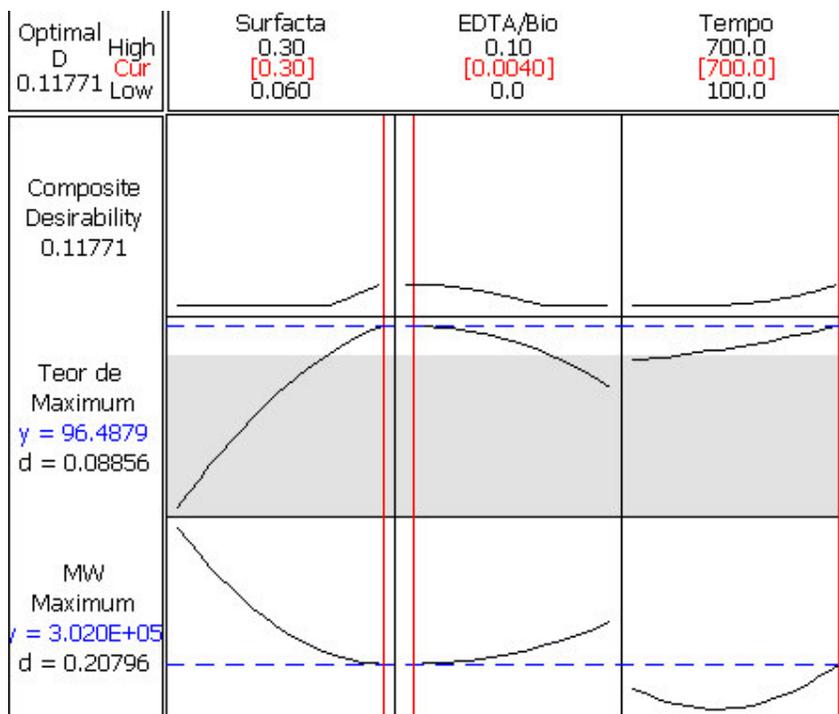


Figura 30: Condição otimizada para obtenção de maior teor de PHB e elevada massa molecular para os 3 fatores tempo, razão surfactante/biomassa e razão EDTA/biomassa.

Assim, baseado nas respostas previstas de acordo com o modelo estatístico ajustado para este estudo, o PHB extraído usando as condições dos fatores como segue:

Surfactante = 0,3 g betaína/ g biomassa

EDTA = 0,004 g EDTA/ g biomassa

Tempo = 700 s

poderá apresentar, em média, com as seguintes propriedades:

Teor de PHB (Pureza) = 96,48%

Massa Molecular = 302062 Da

É importante destacar que a condição otimizada pelo modelo estatístico ajustado é bastante próxima às condições adotadas para o ensaio número 4: 0,3 g

de surfactante, 0,05 g de EDTA e 700 s. (Tabela 25). Nestas condições obteve-se pureza de 95,96% de PHB e massa molecular de 270.272 Da.

Com este resultado, é possível afirmar que o presente trabalho propõe um protocolo adequado de recuperação de PHB utilizando surfactante de origem vegetal, cujas principais vantagens frente aos métodos utilizados atualmente pela indústria são a alta pureza e alto peso molecular, aliada ao baixo potencial de poluição ambiental.

Pode-se, por fim, considerar que o presente estudo representa uma importante contribuição para nortear os próximos passos na busca de um processo tecnológica e economicamente viável para a recuperação de PHB produzido por *Cupriavidus necator* em escala industrial.

6 CONCLUSÕES

- A liberação de proteína no sobrenadante não é fortemente influenciada por nenhum dos fatores estudados, concentração de surfactante, concentração de EDTA e tempo, provavelmente devido a estar diretamente relacionada somente ao rompimento da parede celular das bactérias produtoras de PHA, *Cupriavidus necator*, e não a eficiência da recuperação do PHB. Além disso, uma possível interferência da betaína no método de Lowry deve ser considerada e melhor avaliada.
- A obtenção de um teor elevado de PHB é influenciada positivamente pela presença do surfactante, considerando seu possível mecanismo de ação na ruptura das células, cujo papel seria de desestabilizar a membrana externa bacteriana, favorecendo a recuperação do PHB do interior celular.
- O teor de PHB obtido de 96,5% permite concluir que o método proposto é eficiente na obtenção de um polímero adequado para uma ampla utilização.
- A obtenção de elevada massa molecular não é fortemente influenciada por nenhum dos fatores estudados, concentração de surfactante, concentração de EDTA e tempo, provavelmente devido a estar diretamente relacionada à capacidade e especificidade do método em minimizar danos à cadeia polimérica, extraindo o PHB sem destruir sua cadeia.
- O valor de massa molecular obtido neste estudo de 471100 Da sugere alta eficiência do método em extrair o PHB sem degradar sua cadeia do interior

celular. Isso porque ao compará-lo com o valor de massa molecular do PHB padrão (sem sofrer recuperação pelo método proposto) de 506791 Da, vê-se que o valor de massa molecular reduz cerca de 7%, valor este que não compromete a eficiência da recuperação.

- De acordo com a análise de significância de cada fator, é possível inferir as condições favoráveis para a obtenção de elevado teor de PHB e elevada massa molecular; porém, a significância individual indica que os ajustes são mais efetivos em maximizar a massa molecular ($d= 0,20796$) que maximizar o teor de PHB ($d=0,08856$).
- A condição otimizada pelo modelo estatístico ajustado onde se obtenha um polímero com teor de PHB acima de 95% e massa molecular entre 250000 e 600000 Da é a seguinte: pH = 13, a 50°C, com agitação contínua fixada em 2000rpm, concentração de surfactante a 0,3 g betaína/g biomassa, EDTA a 0,004 g/g biomassa e tempo de tratamento de 700 s, deverá conduzir a obtenção de PHB com pureza de 96,48% e massa molecular de 302062 Da.
- O método proposto de recuperação de PHB a partir da biomassa de *C. necator* usando betaína como surfactante nas condições mencionadas acima possui as seguintes vantagens comparadas aos outros métodos: recuperação é feita sem a necessidade da etapa de purificação, permite a recuperação de PHB sem degradá-lo, baixa toxicidade, e baixo custo no tratamento de resíduos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALMEIDA, C.M.S. **Análise por XPS e AFM da superfície de blendas e PVC/PHB.** Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Física) PUC-Rio, Rio de Janeiro, 2005.

AMASS, W., AMASS A. , TIGHE, B. A review of biodegradable polymers: uses, current developments in their synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. **Pol. Intern.** v.47, p.89-144, 1988.

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

BARHAM, P.J., SELWOOD, A. (1982). Eur. Pat. Appl. 58,480.

BARHAM, P.J. Physical properties of PHB e PHB-HV. **Novel Biodegradable Microbial Polymers.** p. 81, 1991.

BASTIOLI, C. **Handbook of Biodegradable Polymers-** Rappa – 2005.

BAPTIST, J.N. (1962) U.S. Patent 3,044,942

BERGER, E.; RAMSAY, B.A.; RAMSAY, J.A.; CHAVARIE, C. PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. **Biotechnol. Tech.** v.3, n.8, p.227-232, 1989.

BIERMANN, M. *et al.* **Surfactants in Consumer Products- Technology and Application.** Springer-Verlag, 1987.

BYROM, D. Industrial production of copolymer from *Aucaligenes eutrophus*. **Novel Biodegradable Microbial Polymers.** p. 113-117, 1990.

CHASSY, B.M., GIUFFRIDA, A. Method for lyses of gram-positive Asporogenous bacteria with lysozyme. **Appl. and Env. Microbiol.** v.39, n.1, p.153-158, 1980.

CHEN, Y., CHEN, J., YU, C., DU, G., LUN, S. Recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Alcaligenes eutrophus* by surfactant-chelate aqueous system. **Process Biochemistry** v.34, p.153-157, 1999.

CHEN, G.Q., ZHANG, G., PARK, S.J., LEE, S.Y. Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Appl Microbiol Biotechnol** v. 57, p 50-55, 2001.

DE KONING, G.J.M., WITHOLT, B. A process for the recovery of poly(hydroxyalkanoates) from Pseudomonads. Part 1: Solubilization. **Bioprocess Eng.** v.17, p. 7-13, 1997.

DE KONING, G.J.M., KELLERHALS, M., WITHOLT, B. A process for the recovery of poly(hydroxyalkanoates) from Pseudomonads. Part 2. Process development and economic evaluation **Bioprocess Eng** v.17, p. 15-21, 1997.

DELEU, M., PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **C.R. Chimie** v.7, p.641-646, 2004.

DELGADO, C.C.R. **Estudo da biossíntese de Poli-3-hidroxibutirato (P3HB) a partir de óleo de soja.** Dissertação - Mestrado do Instituto de Ciências Biomédicas – (ICB-USP), 2006.

DERENZO, S.; MATSUBARA, R.S.M., GARÓFALO, G.M.C., RIBEIRO, A.M., BUENO NETTO, C.L., MANTELATTO, P.E., ROSELL, C.E.V. **Processo de extração de biopolímeros.** PI 9302312-0, 2002.

Encyclopedia of Bioprocess Technology - Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation, Volumes 1-5, John Wiley & Sons, 1999.

FRITZ, H.G., SEIDENSTÜCKER, T., BÖLZ, U., JUZA, M. Conventional synthetic polymers **In: Study on Production of Thermoplastics and Fibers Based mainly on Biological Materials** ed. Agro-Industrial Research Division, Stuttgart, 1994.

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

GOMEZ, J.G.C., RODRIGUES, M.F.A.; ALLI, R.C.P.; TORRES, B.B.; BUENO NETTO, C.L.; OLIVEIRA, M.S.; SILVA, L.F. Evaluation of soil Gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. **Applied Microbiol and Biotechnol.**, v. 45, p.785-791, 1996.

HAHN, S.K.; CHANG, Y.K., KIM, B.S., CHANG, H.N. Optimization of microbial PHB recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. **Biotechnol. Bioeng.** v.44, p.256-261, 1994.

HÄNGGI, U.J. Pilot scale production of PHB with *Alcaligenes latus*. **Novel Biodegradable Microbial Polymers**, p.65-70, 1990.

HEJAZI, P.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; YAMINI, Y. Supercritical fluids disruption of *Ralstonia eutropha* for PHB recovery. **Biotechnol.Progr.** v.19, p.1519-1523, 2003.

HOCKING, P.J., MARCHESSAULT, R.H. Biopolyesters. **Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers.** p.48-96. 1994.

HOLMES, P.A., LIM, G.B. (1985) Europ. Pat. Appl. 145,233.

HOLMES, P.A. LIM, G.B. (1990) U.S. Patent 4,910,145.

HOROWITZ, D. ; BRENNAN, E. (2001) U.S Patent 20,010,006,802

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

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

KESSLER, B.; WITHOLT, B. Poli(3-hydroxyalkanoates). **Encyclopedia of Bioprocess Technology - Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation.** John Wiley & Sons, 1999.

KHURI, A.I., CORNELL, J.A. **Response Surfaces: Designs and Analyses.** 1987.

KIM, M. *et al.* Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition of sodium dodecyl sulfate. **Biotechnology Letters**. v.25, p.55-59, 2003.

KURDIKAR, D.L.; STRAUSSER, F.E.; SOLODAR, A.J.; PASTER, M.D.; ASRAR, J. (2000) U.S. Patent 6,043,063.

LAFFERTY, R.M.; HERNZLE, E. (1978) U.S Patent 4,101,533.

LAYMAN, P.L. Industrial enzymes battling to remain specialties. **C&EN**, p. 11-14, 1986.

LEE, S.Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates (Review). **Biotechnology and Bioengineering**. v.49, p.1-14, 1996.

LEE, S.Y; CHOI, J. Efficient and economical recovery of poly(3-Hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. **Biotechnology and Bioengineering**, V.62, n. 5, 1999.

LEMOIGNE, M. Products of dehydration and polymerization of β -hydroxybutyric acid. **Bulletin Society Chemistry Biology**. v.8, p.32-36, 1926.

LIDDELL, J.M. (1999) U.S. Patent, 5,894,062.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., TARR, A. L. and RANDALL, R. J., Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. v.193, p. 265–275, 1951.

LU, C.H. **Purification and separation of PHB from bacteria**. Dissertação de Mestrado – Yuan Zé University, Taiwan, 2006.

MEYERS, R.H., MONTGOMERY, D.C. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments**. 1995.

MONTGOMERY, D.C. **Design and Analysis of Experiments**, 5th Edition, 2001.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental pollution**, v.133, p.183-198, 2005.

NAIR, V.N., PREGIBON, D. Analyzing Dispersion Effects From Replicated Factorial Experiments, **Technometrics**, v.30, p. 247-257, 1988.

NODA, I. (1998) U.S. Patent 5,821,299.

NONATO, R.V.; MANTELATTO, P.E.; ROSSEL, C.E.V. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.57, p. 1-5, 2001.

QUEIROZ, S.R.S. **Biossíntese de polihidroxialcanoatos de cadeia média (PHA_{MCL}) por bactérias a partir de óleos vegetais**. Dissertação Mestrado do Instituto de Ciências Biomédicas – (ICB-USP), 2003.

RAMSAY, J.A.; BERGER, E.; RAMSAY, B.A., CHAVARIE, C. Recovery of poly- β -hydroxybutyric acid granules by a surfactant-hypochlorite treatment. **Biotechnol. Tech.** v.4, p.221-226, 1990.

RAMSAY, J.A., BERGER, E., VOYER, R., CHAVARIER, C. RAMSAY, B.A. extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. **Biotechnol. Techn.**, v.8, p.589-94, 1994.

RESCH, S. *et al.* Aqueous release and purification of poly(β -hydroxybutyrate) from *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**.v.65, p.173-182, 1998.

RIIS, V., MAI, W. Gas chromatography determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. Esther hydrochloric acid propanolysis. **J. Chromat.**, v.445, p.285-289, 1988.

ROSEN, M.J. **Surfactants and Interfacial Phenomena** . John Wiley and Sons, 1978.

SASIKALA, C.; RAMANA C.V, NEIDLEMAN, S.L, LASKIN, A.I. Characterization of polyhydroxyalkanoates – Biodegradable plastics from marine bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, v. 42, p. 97–218, 1996.

SILVA, E.S. **Estudo do processo de produção de polihidroxialcanoatos por *Ralstonia eutropha* DSM 545**. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia) USP/IB/IPT, São Paulo, 2000.

SMET, M.J., EGGINK, G., WITHOLT, B., KINGMA, J., WYNBERG, H. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. **J. Bacteriol.** v. 154, p.870–878, 1983.

STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoic Acids. **Biomaterial: Novel Materials from Biological Sources**, p.123-213, 1991.

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

STEINBÜCHEL, A. PHB and other Polyhydroxyalkanoic Acids. **Biotechnology**. Ed. Rhem, H.J. & Reed G., Weinheim, 1996.

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

VANLAUTEN, N.; GILAIN, J. (1982) U.S. Patent 4,310,684.

ZINN, M.; WEILENMANN, H.U.; HANY, R.; SCHMID, M.; EGLI, T.H. Tailored synthesis of PHB-HV in *Ralstonia eutropha* DSM 428. **Acta. Biotechnol.**, v.23,p. 309-316, 2003.

ZUCCOLO, M., RIBEIRO, A.M.M., OGAKI, Y., ALLI, R.C.P., BUENO NETTO, C.L. Utilização de enzimas comerciais no estudo de lise celular de *Alcaligenes eutrophus* DSM 545. **Anais do Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa**, v.4, p.144, 1996.

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](#)