

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

Produção de Polihidroxibutirato: Bioprospecção de *Beijerinckia* sp. da coleção de bactérias do Laboratório de Biopolímeros do CDTec - UFPEl

Claudio Fernando de Oliveira

Pelotas, 2010.

CLAUDIO FERNANDO DE OLIVEIRA

**Produção de Polihidroxibutirato: Bioprospecção de *Beijerinckia*
sp. da coleção de bactérias do Laboratório de Biopolímeros do
CDTec - UFPel**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências (M.Sc.) (área do conhecimento: Biotecnologia).

Orientadora: Prof^a. Dr^a Claire Tondo Vendruscolo

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Angelita da Silveira Moreira

Pelotas, 2010.

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

O48p Oliveira, Claudio Fernando de
 Produção de polihidroxibutirato : bioprospecção de
 Beijerinckia sp. da coleção de bactérias do Laboratório de
 Biopolímeros do CDTec - UFPel / Claudio Fernando de
 Oliveira ; orientador Claire Tondo Vendruscolo ; co-orientador
 Angelita da Silveira Moreira. – Pelotas, 2010. – 95f. –
 Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em
 Biotecnologia. Centro de Desenvolvimento Tecnológico.
 Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

 1.Biotecnologia. 2.*Beijerinckia sp.* 3.Bioprospecção.
 4.Microscopia. 5.Infravermelho. I.Vendruscolo, Claire Tondo.
 II.Moreira, Angelita da Silveira. III.Título.

CDD: 589.90075

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a Claire Tondo Vendruscolo, Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Angelita da Silveira Moreira, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha, Universidade Tecnológica
Federal do Paraná

Prof^a. Dr^a Ligia Furlan, Universidade Federal de Pelotas

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pela força, garra e muita determinação de superar todos os obstáculos e conquistar mais este objetivo com lealdade e muita dignidade.

Esta dissertação é resultado de um trabalho em equipe, do esforço em conjunto de muitos amigos e profissionais, vários laboratórios e departamentos foram utilizados aos quais manifesto o meu agradecimento.

À Universidade Federal de Pelotas, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, por possibilitar a realização desse trabalho, disponibilizando todo aparato necessário ao desenvolvimento desta pesquisa.

À minha orientadora Professora. Dr^a Claire Tondo Vendruscolo, pela oportunidade da realização deste trabalho.

À minha Co-orientadora Professora Dr^a Angelita da Silveira Moreira pela preciosa ajuda no desenvolvimento final do trabalho.

Em especial, gostaria de agradecer algumas pessoas que me ajudaram constantemente durante todo o processo, como Prof. Fábio Pereira Leivas Leite, fonte inesgotável de consulta; ao Pesquisador da Embrapa Luis Antônio Suíta de Castro e sua equipe, Nara e Valter, muitos foram os auxílios na microscopia eletrônica de transmissão (MET) e valiosas conversas.

A Mauro e Simone pelas análises de MET na Faculdade de Veterinária.

À professora Irene Teresinha Santos Garcia, possuidora de um entusiasmo e competência contagiantes.

Ao Prof Rui Carlos Zambiasi e sua equipe de Laboratório pelo apoio na cromatografia gasosa.

Aos amigos e colegas do CDTec - UFPel , do Laboratório de Biopolímeros:

Amanda, Ane, Fernanda, Joyce, Paula, Leidi, Mateus e Carla.

À minha mãe, Madalena, e minha companheira Leniza Coelho, pelo suporte, apoio e incentivo.

Ao Exército Brasileiro, Cap Carlo e Cel Márcio Melo por terem me permitido dar continuidade em meus estudos.

RESUMO

OLIVEIRA, Claudio Fernando. **Produção de Polihidroxibutirato: Bioprospecção de *Beijerinckia* sp., da coleção de bactérias do Laboratório de Biopolímeros do CDTec - UFPel**. 2010. 94f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Fatores como a crescente preocupação com o impacto ambiental causado pelo descarte dos resíduos plásticos petroquímicos no meio ambiente devido sua baixa degradabilidade e o constante aumento do preço do petróleo levaram a uma busca mundial por inovações como a produção dos bioplásticos. Os bioplásticos são polímeros produzidos por microrganismos a partir de matérias-primas renováveis com propriedades semelhantes aos plásticos derivados do petróleo, como polipropileno e polietileno. Os bioplásticos mais promissores são os polihidroxialcanoatos, que compreendem uma grande família de poliésteres acumulados na forma de grânulos intracelulares por microrganismos como as bactérias. O tipo mais comum é o poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)); este polímero desperta grande interesse por ser biocompatível, biodegradável e termoplástico. O objetivo deste trabalho foi realizar uma bioprospecção entre cepas de *Beijerinckia* sp. da coleção de cultura de microrganismos do CDTec – UFPel para seleção de cepas possivelmente produtoras de P(3HB). Inicialmente, foram cultivadas 7 cepas em meio sólido, YM e YDC, e as células coradas com Negro de Sudão B para visualização por Microscopia Óptica, sendo selecionadas 3 cepas para posterior análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão; os dados revelaram um forte indício da produção de grânulos de P(3HB) pela cepa C31 já na fase de multiplicação celular. Foi avaliada a produção de biopolímero em 3 meios; o melhor resultado foi obtido com o meio F4, sendo uma concentração de $0,93\text{gL}^{-1}$ de polímero e conteúdo de 34 %. O polímero foi identificado, e dosado, por Cromatografia Gasosa como P(3HB). A identidade do polímero foi confirmada por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). Os espectros revelaram bandas características de P(3HB), confirmando a produção deste polímero pela cepa C31, que foi considerada com potencialidade para produção industrial.

Palavras-chave: PHB, *Beijerinckia* sp., Bioprospecção, Microscopia, Infravermelho

ABSTRACT

OLIVEIRA, Claudio Fernando. Production of Polyhydroxybutyrate: Bioprospecting for *Beijerinckia* sp. Collection of bacteria from the Laboratory of Biopolymers CDTec - UFPel. 2010. 94f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Factors like the frequent worry with the environmental impact cause by the discard of petrochemical plastic waste in the environment due to its low degradability and the constant increase of petrol price took to a world search for innovations with the production of bioplastics. They are the polymers produced by microorganisms from the renewable raw material with properties similar plastic derived from petrol, such as polypropylene and polyethylene. The more promising bioplastics are the polyhydroxyalkanoates, which comprehend a great polyester family accumulated in the form of intracellular granules by microorganisms like bacteria. The most common type is the poli(3 hydroxybutyrate) P(3HB); this polymer brings great interest for being biocompatible, biodegradable and thermoplastic. The objective of this study was to realize a bioprospecting between *Beijerinckia* sp. strains from the collection of microorganism culture from CDTec – UFPel for the selection of possible producer strains of P (3HB). Initially, 7 strains were cultivated in solid mean, YM and YDC, and colored cell with Sudan Black for Optic Microscopy visualization, when 3 strain were selected for further analysis through Transmission Electronic Transmission; the data revealed a strong evidence of granules P(3HB) production by strain C31 in the cellular multiplication phase. The biopolymer production was evaluated in 3 means, the best result was obtained with F4 mean, being a concentration of 0,93 gl of polymer and content of 34%. The polymer was identified, and measured, by Gas Chromatography as P(3HB). The polymer identity was confirmed for Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). The spectra revealed characteristic bands of P(3HB), confirming the production of this polymer by C31 strain, which was considered with great power for the industrial production.

Keywords: PHB, *Beijerinckia* sp. Bioprospecting, Microscopy, Infrared

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1	Estrutura geral dos PHAs.....	17
Figura 2	Ciclo da obtenção e biodegradação dos polihidroxicanoatos.....	21
Figura 3	Esquema do grânulo de PHB.....	24
Figura 4	Imagens de MET dos grânulos de PHA em diferentes bactérias.....	26
Figura 5	Esquema de limitação nutricional para a produção de PHA.....	30

Artigo

Figura 1	Microscopia óptica de células das cepas C31, T125 e 7070 cultivadas em meio YM durante 24 e 48 h, coradas com Negro de Sudão B. Objetiva de imersão aumento 1000x.....	53
Figura 2	Microscopia óptica de células das cepas C31, T125 e 7070 cultivadas em meio YDC durante 24 h e 48 h, coradas com Negro de Sudão B. Objetiva de imersão aumento 1000x.....	54
Figura 3	Fotomicrografia por MET utilizando meio F2 na fase de acúmulo de grânulos, após 48 h de cultivo	57
Figura 4	Curva de crescimento celular da cepa C31 no meio F1.....	61
Figura 5	MET da cepa C31 para acompanhamento do acúmulo de grânulos lipofílicos em células cultivadas nos meios F1, durante 24 h (fase 1), e F3 (fase 2) em diferentes tempos.....	62
Figura 6	MET da cepa C31 para acompanhamento do acúmulo de grânulos lipofílicos em células cultivadas nos meios F1 durante diferentes tempos	

(fase 1) e por 48 h nos meio F2 e F4, respectivamente.....	64
Figura 7 Evolução da concentração da biomassa (A), evolução da concentração de açúcares no meio de cultivo (B), porcentagem de acúmulo de P(3HB) (C), evolução da concentração de P(3HB) g.L ⁻¹ (D) para os meio F3, V e F2, utilizando a cepa de <i>Beijerinckia</i> sp. C31.	68
Figura 8 Cromatogramas do material lipofílico acumulado pela cepa C31 nos meios F2, F3 e F4 em 72 h e do padrão derivatizados. (1) P(3HB) e (2) padrão interno.....	70
Figura 9 Fotografia do filme de P(3HB) extraído de células da cepa C31 e obtido por evaporação lenta.	70
Figura 10 Espectro FT-IR para o polímero produzido pelo meio F2 Cepa C31.....	71

LISTA DE TABELAS

Revisão de literatura

Tabela 1 Principais características do P(3HB) e do PP.....**19**

Tabela 2 Substratos de baixo custo utilizados para produção de P(3HB).....**35**

Artigo

Tabela 1 Resultados do teste Negro Sudão B para as sete cepas em YM e YDC Sólido.**55**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIPLAST - Associação Brasileira da Indústria de Plástico

AFM - Microscopia de Força Atômica

CDTec - Centro de Desenvolvimento Tecnológico

CTC - Centro Tecnológico Coopersucar

Da - Dalton

DNS - Ácido Dinitrossalicílico

DSC - Calorimetria Diferencial de Varredura

FT-IR - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

GC - Cromatografia Gasosa

HA - Hidroxiácido

HB - Hidroxibutírico

HV- Hidroxivalérico

3HV - Ácido-3-Hidroxivalérico

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

IPT - Instituto de Pesquisa Tecnológica

MCS - Massa Celular Seca

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MO - Microscopia Óptica

nPHA - Grânulo Nativo de PHA

PET - Politereftalato de Etileno

PHAcl - Polihidroxialcanoatos de Cadeias Longas

PHAmcl - Polihidroxialcanoatos de Cadeias Médias

PhaP - Proteínas Fasinas

PHAs - Polihidroxialcanoatos

PHAscI - Polihidroxialcanoatos de Cadeias Curtas

P(3HB) - Poli(3-hidroxibutirato)

P(3HB-co-3HV) - Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)

P(3HB-co-4HV) - Poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxivalerato)

PHB - Polihidroxibutirato

PHO - Poli 3-hidroxioctanoato

PP - Polipropileno

TGA - Análise Termogravimétrica

Ton - Tonelada

UFC mL⁻¹ - Unidades Formadoras de Colônia por mL

YDC - Meio Yeast extract-dextrose-calcium-carbonate

YM - Meio Yest-extract Malt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Polihidroxialcanoatos – (PHAs).....	16
2.1.1 Descrição dos polihidroxialcanoatos (PHAs).....	16
2.1.2 Características e propriedades	17
2.1.3 Poli(3-hidroxibutirato).....	19
2.2 Biodegradabilidade.....	21
2.3 Grânulos de PHA.....	22
2.4 Aplicações	27
2.5 Microrganismos produtores.....	28
2.5.1 Beijerinckia sp.	31
2.6 Bioprospecção	31
2.7 Produção de Polihidroxialcanoatos (PHAs)	33
2.7.1 Fatores que afetam os custos de produção dos (PHAs)	34
2.7.1.1 Utilização de substratos de baixo custos	34
2.7.1.2 Produtividade e conteúdo de PHA nas células	35
2.7.1.3 Processos de Extração e Recuperação.....	36
2.8 Técnicas empregadas na visualização e detecção dos grânulos de PHA.....	37
2.9 Identificação e caracterização de P(3HB)	39
2.9.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	39
3 ARTIGO.....	41
Resumo.....	42
Introdução.....	44
Experimental.....	45
Resultados e Discussão.....	52
Conclusão.....	73
Referências.....	73
4 CONCLUSÕES.....	79
5 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS.....	80
6 REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

Os plásticos, materiais poliméricos derivados do petróleo, podem ser considerados uma das mais importantes invenções proporcionadas pela tecnologia nos últimos tempos, em relação ao conforto e economia que proporcionam aos usuários. Esses polímeros estão fortemente presentes em nossa vida cotidiana, com destaque para a grande quantidade de artefatos produzidos para diferentes aplicações como embalagens para alimentos e bebidas, materiais de higiene, peças para automóveis, componentes eletrônicos, tapetes. Desde a sua descoberta em 1935, têm sido largamente utilizados de maneira original e inovadora em substituição a outros materiais como metais e madeira; devido a características como versatilidade, resistência e durabilidade eles se tornaram um material imprescindível, popular e muito presente em nosso cotidiano (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005).

O acúmulo destes materiais plásticos no meio ambiente, devido ao seu consumo irrestrito e sua baixa degradabilidade, vem causando graves problemas ambientais em todo mundo (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005). Alguns plásticos petroquímicos exigem mais de 100 anos para sua degradação total (ROSA, 2004). Considerando que a população humana tem crescido, mas sem diminuir ou minimizar o uso dos plásticos, isto tem gerado grande quantidade de acúmulo de resíduos não degradáveis no meio ambiente, os quais estão afetando a sobrevivência de várias espécies (LUENGO, 2003). Milhares de toneladas de resíduos plásticos são depositados no meio ambiente marinho todos os anos e se acumulam em algumas regiões dos oceanos (REDDY, 2003). Animais marinhos estão sendo encontrados mortos com grande quantidade de plásticos em seu interior devido ao crescente volume dessa utilização e as implicações inerentes ao seu descarte não racional pós-consumo.

O excesso do lixo plástico tem causado inúmeros transtornos com grandes prejuízos também nas cidades, sendo o principal causador de obstrução parcial da rede de esgoto. E esse fator tem propiciado o aumento dos danos provocados por

enchentes, indo desde a destruição de residências até mesmo morte de pessoas e animais. Também o meio ambiente rural não tem sido poupado dessa poluição, causada pelo descarte indevido de embalagens dos insumos utilizados nas práticas agrícolas, de grandes extensões, as quais têm contribuído para provocar graves danos ambientais (SERAFIGIM, 2002).

O consumo mundial de plástico em 2008 foi na ordem de 200 milhões de toneladas (SIRACUSA et al., 2008). Já em 2009 foi cerca de 230 milhões de toneladas. Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Plástico (ABIPLAST), o consumo de material plástico por pessoa é cerca de 27 Kg (ABIPLAST, 2008). No Brasil, neste mesmo ano, foram processadas 5,41 milhões de toneladas de resinas termoplásticas, com um consumo de plásticos de 5,29 milhões de toneladas (ABIPLAST, 2009). Como as embalagens plásticas utilizadas pela indústria alimentícia são frequentemente contaminadas por substâncias biológicas e matéria orgânica, isso torna a reciclagem economicamente inviável; com isso essas embalagens plásticas são depositadas no meio ambiente causando graves desequilíbrios ambientais (KIRWAN, STRAWBRIDGE, 2003). O aprimoramento de plásticos que permitem estender a vida de prateleira do produto e aumentar sua durabilidade, por meio da selabilidade e cozimento a vapor, trouxe uma ampliação para este mercado com uma previsão de crescimento até 2012, e de acordo com estimativas da empresa de pesquisas de mercado Euromonitor, em 2009, o número de embalagens de poli (tereftalato de etileno) (PET) produzidas vai aumentar ainda em até 350 bilhões/ano (HAYASAKI, 2009).

No início da década de 90, a Organização Internacional para Padronização - ISO apontou a necessidade de se desenvolverem normas sobre a questão ambiental e que tivessem como objetivo a padronização dos processos de empresas que utilizassem recursos tirados da natureza e/ou causassem algum dano ambiental decorrente de suas atividades. Também, em resposta à demanda mundial por uma gestão ambiental mais confiável, foram estruturadas e implementadas as normas ISO Tipo 1 (14024) Selos Verdes/ Certificação por Terceiros e ISO Tipo 2 (14021) Auto Declaração, as quais atualmente são adotadas por empresas que buscam a eco-eficiência (ISO 2009). Embora esse movimento de sustentabilidade do planeta, já exista há duas décadas, com a preocupação da não poluição, não contaminação e racionalização de uso de produtos descartáveis, bem como a busca do fortalecimento da ecoeficiência, mesmo assim o uso de embalagens plásticas

continua crescendo. Com isso a capacidade das áreas de depósitos de lixo e dos aterros sanitários está sendo comprometida devido ao grande acúmulo de lixo plástico (GOMEZ; BUENO NETTO, 1997).

A conscientização dos usuários dos plásticos com relação aos benefícios *versus* poluição ambiental e também a produção de produtos similares que não poluam, a um custo competitivo, são os fatores que poderão modificar a situação atual da poluição. Possivelmente os plásticos sintéticos poderão ser substituídos por biodegradáveis na fabricação de embalagens, podendo ser uma alternativa para reduzir o grande volume de resíduos plásticos no meio ambiente (FIORESE, 2008).

Várias alternativas de produção de plásticos biodegradáveis têm sido estudadas com o objetivo de substituir parcialmente os plásticos sintéticos derivados do petróleo e, assim, minimizar os problemas ambientais causados por esses polímeros. Dentre eles estão os polihidroxialcanoatos (PHAs), polímeros bacterianos totalmente biodegradáveis e que são produzidos a partir de matérias-primas completamente renováveis (SILVA et al., 2007). Outra possibilidade é o desenvolvimento de materiais mistos a base de polímeros sintéticos com outros polímeros que apresentem suscetibilidade natural a ação de degradação por microorganismos no ambiente (FIORESE, 2008). Os plásticos derivados petroquímicos apresentam índices de decomposição variáveis e quase desprezíveis pelos elementos ambientais como luz, umidade, calor e microrganismos. Na escolha das embalagens, visando à redução do impacto ambiental e a sustentabilidade do planeta, consumidores conscientes deverão avaliar as vantagens de optar por produtos e serviços que causem o menor dano ambiental possível durante o seu ciclo de vida. E esta tem sido a proposta dos mentores do desenvolvimento dos plásticos biodegradáveis, produzidos a partir de PHAs e polihidroxibutirato (PHB).

Os PHAs são biopolímeros que possuem propriedades como biodegradabilidade, biocompatibilidade, além de serem termoplásticos e poderem ser produzidos através do uso de fontes renováveis de matéria-prima, o que lhes confere grande potencial de aplicação (JENDROSSEK, 2007). As utilizações mais conhecidas são na confecção de embalagens biodegradáveis de uso geral e de alimentos; em fios de suturas e próteses na área médica. Na agricultura são usados como veículo para inoculante e matriz para liberação controlada de agrotóxicos (MADSON; HUISMAN, 1999; CHEN; WU, 2005; SAVENKOVA et al., 2001). Os organismos mais estudados para produção de PHA são *Ralstonia* sp., *Azotobacter*

sp., *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp. Culturas puras usadas industrialmente para produzir PHAs incluem a *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* e diversas espécies de *Pseudomonas* (SERAFIM; LEMOS; REIS, 2003). O polihidroxibutirato P(3HB) é o biopolímero pertencente a essa grande família mais estudado por possuir algumas propriedades físicas, como ponto de fusão, grau de cristalinidade e temperatura de transição vítrea comparáveis ao polipropileno (PP) (HOLMES, 1985).

No final da década de 90 foi criada no Brasil a Estratégia Nacional de Diversidade Biológica ou Biodiversidade que trata da utilização sustentável de componentes da diversidade biológica e incentivos, os quais mais tarde deram sustentação à estruturação da bioprospecção. (VIANA; VERÍSSIMO; PINHEIRO, 1998). A bioprospecção tem como principal objetivo a busca de recursos genéticos e bioquímicos para fins comerciais (ARTUSO, 2002). A bioprospecção no Brasil foi definida pela Medida Provisória nº 2.186-16/01, como sendo a “atividade exploratória que visa identificar componente do patrimônio genético e informação sobre conhecimento tradicional associado, com potencial uso comercial” (art.7º, inc. VII). Mundialmente, no entanto, existem muitos conceitos para definir bioprospecção; todos, no entanto convergem para o uso ou aproveitamento de forma tecnológica de componentes da biodiversidade para fins comerciais. A biotecnologia, através do seu desenvolvimento, tem mostrado que quanto mais diversidade de vida um país possui, maior será a possibilidade de desenvolvimento e industrialização de novos produtos (MMA, 1998 apud Viana et al. 1998; SANTOS, 2002). A bioprospecção da biodiversidade baseia-se em princípios e ações para o uso sustentável e tornou-se ferramenta importante em pesquisas envolvendo microrganismos, como por exemplo, a biorremediação de áreas degradadas, a produção de probióticos, o tratamento de efluentes e a produção de biopolímeros (AZEVEDO, 2003).

Este trabalho partiu da hipótese de que espécies de *Beijerinckia* sp., preservadas na Coleção de Culturas de Microrganismos do Laboratório de Biopolímeros do CDTec/UFPel, que apresentam formação de corpos lipofílicos, são capazes de produzir e acumular biopolímeros do tipo P(3HB). Com o objetivo de bioprospectar esta coleção quanto à capacidade destas espécies de *Beijerinckia* produzirem P(3HB), foi avaliado o potencial de produção por meio da detecção dos grânulos, extração e caracterização do polímero produzido.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Polihidroxialcanoatos

2.1.1 Descrição dos Polihidroxialcanoatos (PHAs)

PHAs são poliésteres com várias unidades de hidroxiácidos (HAs)¹ que podem ser acumulados por diversas bactérias, em grande quantidade, sem afetar a pressão osmótica das células. Depois de sintetizados os acúmulos formam os grânulos intracelulares (PREUSTING, 1992). A função mais frequentemente atribuída a estes grânulos é a de reserva de carbono, energia e equivalentes redutores. Porém, quando há limitação de carbono ou energia, mas não de outros nutrientes, estes PHAs podem ser reutilizados para suprir essa necessidade. Para muitos microrganismos com capacidade de sintetizar PHAs, essa síntese ocorre somente sob a condição de limitação de um nutriente essencial como P, Fe, Mg, N, e com excesso da fonte de carbono. Esse processo é realizado em duas fases, sendo a fase inicial de crescimento não limitado, visando o crescimento celular, seguida de uma da fase limitada em um dos nutrientes essenciais, para produção e acúmulo de polímero (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005). *Ralstonia eutropha* é um exemplo de microrganismo que sintetiza P(3HB) em duas etapas (BYROM, 1987). Para outros microrganismos, como *Alcaligenes latus* e para uma linhagem mutante de *Azotobacter vinelandii*, e também *Escherichia coli* recombinante, não é necessário a limitação de qualquer dos nutrientes essenciais para que ocorra a produção de PHAs. Para estes, o acúmulo pode ocorrer nas primeiras horas da produção (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005).

¹ Hidroxiácido é um ácido carboxílico em que existe um grupo hidroxila em um carbono próximo da carboxila. Conforme o carbono com a hidroxila se afasta do carbono da carboxila, temos os alfa-hidroxiácidos (ácido láctico, ácido cítrico), beta-hidroxiácidos (ácido beta-hidroxibutírico, carnitina), gama-hidroxiácidos (ácido gama-hidroxibutírico).

Os PHAs são similares aos termoplásticos sintéticos a exemplo do polipropileno, por terem essa similaridade podem substituí-lo. A biodegradação do bioplástico é total, chegando a H_2O e CO_2 em condições adequadas do ambiente e aerobiose e a metano em anaerobiose (KULPREECHA et al., 2009).

2.1.2 Características e propriedades

A principal característica destes polímeros é ser biodegradável, mas são também biocompatíveis, com alta regularidade de cadeia polimérica e alta massa molar, o que permite as inúmeras aplicações industriais deste material. A estrutura geral dos PHAs é mostrada na Figura 1. A natureza do valor do radical R e o valor de n vai determinar a identidade das unidades monoméricas, que constituem os polímeros e co-polímeros, e vão influenciar nas suas propriedades físicas (LEE, 1996; MADISON; HUISMAN, 1999). As principais propriedades físicas são massa molar elevada, elevada temperatura de fusão, cristalinidade, resistência a tração semelhantes ao PP; além disto, este material é termoplástico não tóxico e biocompatível.

Já foram identificados mais de 150 diferentes monômeros de HAs, como constituintes dos PHAs produzidos por várias bactérias utilizando diferentes fontes de carbono. No entanto poucos são produzidos em quantidades suficientes para caracterização e desenvolvimento de aplicação comercial (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995).

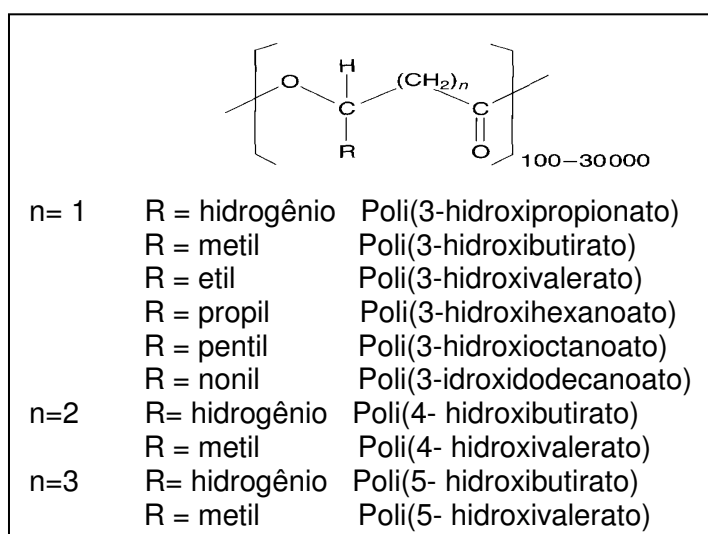


Figura 1 - Estrutura geral dos PHAs
Fonte: LEE, 1996, adaptado.

Na estrutura química dos PHAs (Fig.1) o radical R pode variar de um átomo de hidrogênio a quatorze átomos de carbono; esse grupo pode possuir insaturações, ligações com grupos aromáticos ou até ligações com halogenados. Nos PHAs que possuem cadeias lineares o processo de polimerização ocorre devido a ligações entre o grupamento carboxila de um monômero com o grupamento hidroxila de outro monômero (MADISON; HUISMAN, 1999; LUENGO et al., 2003).

A massa molar destes polímeros depende do tipo de microrganismo que o produz juntamente com as condições de cultivo e, geralmente, varia de 1.10^5 a 4.10^6 Da (Daltons) (AGUS et al., 2006). Também Chen e Page (1994) reportaram a produção de P(3HB) por *A. vinelandii* com massa molar da ordem de 4.10^6 Da. Entretanto, já foi encontrado P(3HB) com massa molar de 20.10^6 Da produzido por *E. coli* recombinante (KUSAKA et al., 1997). O tamanho e composição das cadeias dos PHAs são dependentes das condições operacionais de produção e das vias metabólicas dos microrganismos. São elas que vão determinar suas propriedades, logo é fundamental o domínio sobre o processo de síntese, o que permite a produção de PHA sob medida para as aplicações que se desejar (STEINBÜCHEL; EVERSLÖH, 2003; SRIVASTAVA; KHANNA, 2005; SHAH et al., 2008).

De acordo com o comprimento das cadeias carbônicas e de suas unidades monoméricas, os PHAs são classificados em 3 grupos: 1) PHAs de cadeia curta (PHASCL- Short chain length) contendo unidades monoméricas de 3 a 5 átomos de carbono; 2) PHAs de cadeia media (PHAMCL- Medium chain length), constituídos de 6 a 14 átomos de carbono na cadeia; 3) PHAs de cadeia longa (PHALCL- long chain length), apresentando mais de 15 átomos de carbono (LUENGO et al., 2003). As características dos PHAMCL são semelhantes aos termoplásticos elastoméricos enquanto os PHASCL são próximos aos termofixos (MADISON; HUISMAN, 1999; LEE et al., 2000). As características destes poliésteres bacterianos, dependendo de sua aplicação e propriedades desejadas, podem ser modificadas; também podem fazer parte de blendas com outros polímeros (CHEN; WU, 2005).

As propriedades físicas e mecânicas dos bioplásticos podem ser moldadas, durante o processo de biossíntese. Dessa forma pode-se obter biopolímeros com propriedades similares aos polímeros sintéticos usados na indústria. É grande o número de publicações que tem relatado as propriedades, características e aplicações dos PHAs e seus copolímeros; poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)

[P(3HB-co-3HV)], poli (3-hidroxi butirato-co-4-hidroxi valerato) [P(3HB-co-4HV)] e poli(3-hidroxi octanoato) [P(3HO)].

2.1.3 Poli (3-hidroxi butirato)

O PHA mais extensivamente estudado e caracterizado é o P(3HB), que é um homopolímero composto de unidades monoméricas de 4 átomos de carbono ($R = CH_3$ e $n = 1$) e seu copolímero poli(3-hidroxi butirato-co-valerato) [P(3HB-co-3HV)] (SRIVASTAVA; KHANNA, 2005). Os P(3HB) foram descobertos por Maurice Lemoigne, pesquisador do Instituto Pasteur, quando observou a presença de PHB em bactérias do gênero *Bacillus megaterium*. Porém esta primeira observação ficou esquecida até 1962 (LUENGO et al., 2003). O P(3HB) pode ser comparado ao polipropileno (PP) por suas características semelhantes de massa molar, temperatura de fusão, cristalinidade e resistência à tração. Entretanto, apresenta algumas vantagens em relação ao PP, pois não é tóxico, apresenta resistência à luz ultravioleta, melhor barreira à gás, à gordura e ao odor (HANKERMEYER, 1999; HOLMES, 1988; SERAFIM, 2004). As propriedades do P(3HB) em relação ao PP podem ser vistas na tab. 1.

Tabela 1 - Principais características do P(3HB) e do PP

Características	P(3HB)	(PP)
Temperatura de fusão (T _m)	180 °C	174 °C
Temperatura de transição vítrea (T _g)	5 °C	-17 °C
Módulo de elasticidade (módulo de Young)	3.500 MPa	1.700MPa
Densidade	1.18 - 1.25 g.cm ³	0,91 g.cm ³
Permeabilidade ao oxigênio	45 cm ³ m ⁻² atm ⁻¹ d ⁻¹	1.700 cm ³ m ⁻² atm ⁻¹ d ⁻¹
Resistência à ruptura	5 %	400 %
Massa molar média	1 - 8.10 ⁵ Da	2,2 - 7. 10 ⁵ Da
Grau de cristalinidade	70 %	70 %
Resistência ao UV	Boa	Pouca
Resistência a solventes	Pouca	Boa
Biodegradabilidade	Boa	-

Fonte: Gomez; Bueno Netto, 1997 e Bucci, 2003, adaptado.

Como pode ser visto na tab. 1 o P(3HB), apesar de sua similaridade ao polipropileno, possui resistência à ruptura muito inferior a este, é mais rígido e quebradiço além de apresentar ponto de fusão muito próximo à temperatura de decomposição, indicando baixa estabilidade e difícil processabilidade, o que limita seu uso em diversos setores da indústria (SUDESH; ABE; DOI, 2000; ZHANG et al., 2000). No entanto, as propriedades do P(3HB) podem ser modificadas com a introdução de unidades de ácido 3-hidroxiválerico (3HV) e 4-hidroxibutírico (4HB), tornando o copolímero mais flexível e de maior processabilidade do que o P(3HB) (MADISON; HUISMAN, 1999).

Apesar das suas excelentes propriedades, seu custo de produção ainda é muito elevado em comparação com os plásticos petroquímicos (SERAFFIM, 2004). Com o avanço da biotecnologia têm-se desenvolvido soluções no sentido de reduzir os custos como: a utilização de substratos mais baratos, geralmente resíduos agroindustrial; estratégias fermentativas com culturas com alta densidade celular; seleção de linhagens altamente eficientes na conversão do substrato ao produto; modulação da massa molar e otimização de processos de extração (SILVA et al, 2007; LEE, 1999).

Na Fig. 2 é mostrado o biociclo fechado da produção de P(3HB) até a biodegradação a partir do cultivo de cana-de-açúcar ou outras culturas, que utilizam a luz solar para a fotossíntese, em que o CO_2 e H_2O são convertidos em carboidratos como a glicose. Estes açúcares fornecem o carbono necessário para a produção de PHA por meio de um processo fermentativo. Na etapa seguinte o polímero é extraído e podem ser utilizados na produção de plásticos biodegradáveis. Os PHAs apresentam boa estabilidade durante o uso normal, mas quando depositados no ambiente, são metabolizados por microrganismos degradando-se totalmente até CO_2 e H_2O (GARCIA, 2006).

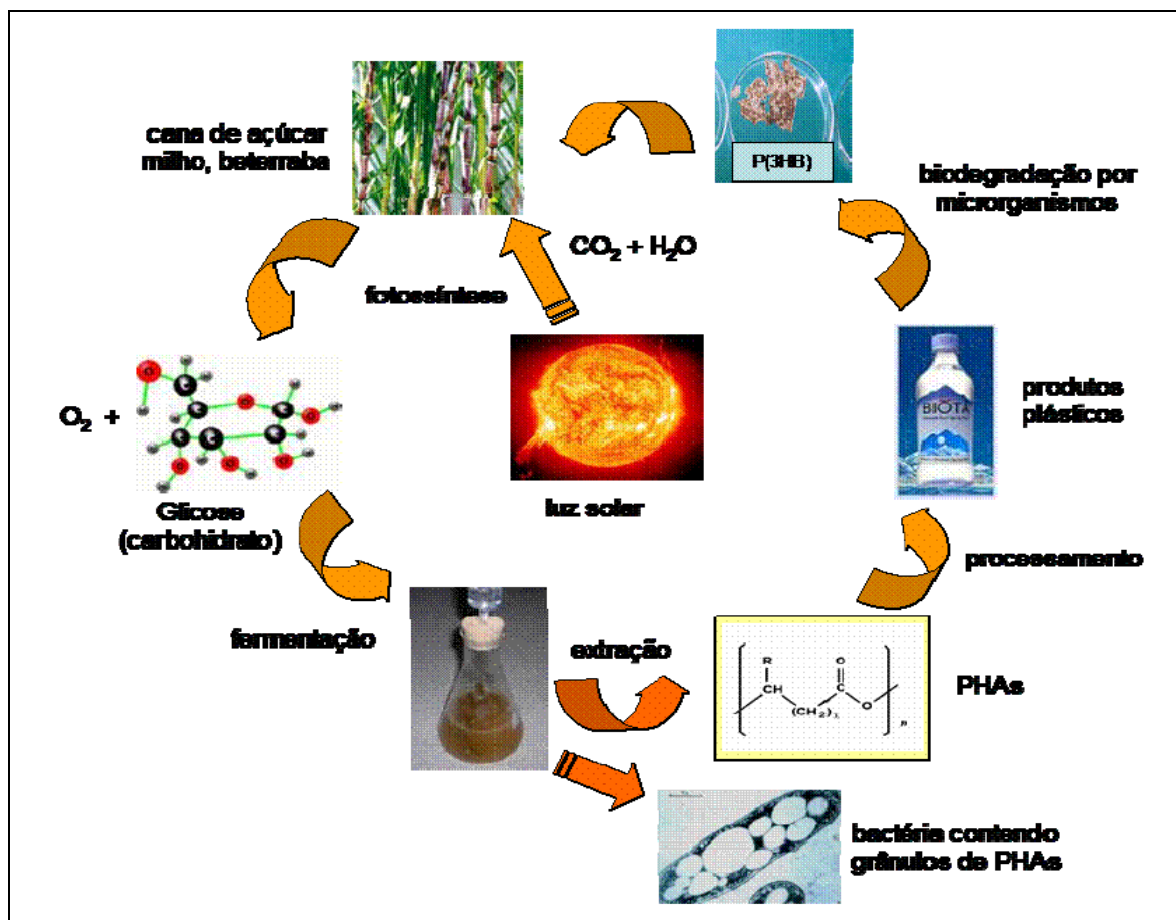


Figura 2- Ciclo da obtenção e biodegradação dos polihidroxicanoatos.
Fonte: GARCIA, 2006.

No Brasil o P(3HB) produzido por via fermentativa é conhecido como Biocycle®, que utiliza produtos derivados de cana de açúcar, passando pelas etapas de síntese, extração e purificação do polímero com solventes naturais. E sendo a produção em consórcio com uma indústria açucareira, seu sistema de manufatura integrado é ecologicamente correto.

2.2 Biodegradabilidade

A biodegradação pode ser definida como a decomposição de matérias por ação dos microrganismos, com modificações físicas e ou químicas, sob certas condições de temperatura, luz, oxigênio, nutrientes orgânicos e minerais (LUCAS et al., 2008). Este tem sido o grande atrativo dos PHAs (KULPREETCHA et al., 2009). E esta pode ocorrer em vários ambientes como no solo ou na água do mar. A biodegradação aeróbica ocorre pela ação de microrganismos resultando em biomassa, CO₂ e H₂O enquanto que biodegradação anaeróbica resulta em CH₄,

biomassa, CO₂ e H₂O (REDDY et al., 2003). Segundo Luzier (1992), o tempo necessário para biodegradação de um filme de 1 mm de P(3HB-co-3HV) é diferente em diferentes ambientes, sendo de 6 semanas em ambiente anaeróbio, 60 em ambientes aeróbios e de 350 semanas em água do mar.

Os PHAs, ao passo que são acumulados intracelularmente na forma de grânulos como reserva de carbono, também podem ser degradados intracelularmente por PHA depolimerases quando sob condições de limitação de nutrientes e utilizados pelos microrganismos (GU et al., 2003).

Estudos mostram claramente a distinção entre degradação intracelular e extracelular dos PHAs; a intracelular é uma atividade de degradação das reservas energéticas acumuladas pela própria bactéria sintetizadora quando, no meio, não se proporciona nutrientes para manter seu metabolismo. A degradação extracelular é a utilização do polímero após a morte celular, por diferentes microrganismos os quais não necessariamente acumulam este tipo de material, mas que secretam PHA depolimerases (UCHINO, 2007). Têm-se desenvolvido maiores estudos em relação a depolimerases extracelulares do que intracelulares; assim, se tem pouco entendimento sobre o mecanismo pelo qual o grânulo nativo de PHA pode ser reutilizado pelo microrganismo (REHM et al., 2009).

Pesquisas desenvolvidas com *Legionella pneumophila* demonstraram que este microrganismo com PHB acumulado poderia sobreviver mais de 600 dias (JAMES et al., 1999); sendo que a taxa de degradação intracelular de P(3HB) é aproximadamente dez vezes menor do que sua síntese (SUDESH; ABE; DOI, 2000).

2.3 Grânulos de PHA

Os PHAs são sintetizados e armazenados intracelularmente em grânulos esféricos insolúveis, sendo altamente refráteis, podendo ser observados em Microscopia Óptica (MO) por coloração com Negro de Sudão B, e em Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), onde aparece como corpúsculos elétron-densos e opacos (LUENGO et al., 2003; GRAGE et al., 2009). Griebel, Smith e Merrick (1968) foram os primeiros a observar os grânulos de P(3HB), em *B. megaterium*; e descreveram sua composição como 97,7 % de P(3HB), 1,87 % de proteínas e 0,46 % de lipídeos. Mais tarde, outros pesquisadores como Steinbuchen et al. (1995) e Stubbe et al. (2005) confirmaram que os grânulos são envolvidos por uma típica

membrana fosfolipídica, de 3 a 20 nm de espessura, dependendo da espécie, com várias proteínas catabólicas e não catabólicas associadas à membrana.

O tamanho e a quantidade dos grânulos dependem da espécie dos microrganismos; o diâmetro varia, normalmente, de 0,2 a 0,5 μm e de 5 a 20 grânulos por célula, acumulando até 90% de seu peso seco (ANDERSON; DAWES, 1990). Em estudos com *Acaligenes eutrophus* foram encontrados de 8 a 12 grânulos de diferentes tamanhos (HOLMES et al., 1987). *Pseudomonas oleovorans* geralmente possui 1 a 2 grandes grânulos (KLINKE, et al., 1999). Em *Pseudomonas* degradadoras de agrotóxico foram encontrados de 3 a 6 grânulos, sendo a variação dos diâmetros de 0,4 a 0,66 μm (CROCHEMORE, 2010). No estudo com *Rastonia eutropha*, que é um microrganismo capaz de acumular grande quantidade de PHAs, foi verificado que o número de grânulos varia de 1 a 4 e o tamanho de seus grânulos são na faixa de 0,2 a 0,5 μm (JENDROSSEK et al., 2007).

É bem conhecido na literatura que *Delftia acidovorans* é uma bactéria capaz de acumular eficientemente o PHA. Em estudo recente com MET, foi mostrado que células de *D. acidovorans* contendo grânulos de P(3HB) são menores que aquelas contendo seu copolímero P(3HB-co-3HV) e também que os próprios grânulos de P(3HB-co-3HV) são maiores que P(3HB). Foram encontrados mais de 7 grânulos de P(3HB) e mais de 3 P(3HB-co-3HV) por células. Interessantemente, os grânulos de P(3HB-co-3HV) ocupavam quase o volume total da célula. No entanto, isto não correspondeu à mais alta quantia de polímero por célula, sendo que os grânulos de P(3HB-co-3HV) foram menos densos do que P(3HB) e P(4HB), respectivamente (SUDESH; LOO, 2007).

Vários fatores envolvidos, tanto na síntese dos grânulos de P(3HB) quanto na sua mobilização, depolimerização e integridade morfológica dos grânulos estão associados à sua membrana (GRIEBEL; SMITH; MERRICK, 1968). Na Fig. 3 é apresentado um esquema do grânulo de P(3HB), mostrando o núcleo constituído de PHA recoberto por uma camada de lipídios com proteínas integradas, sendo a camada hidrofóbica voltada para o centro do grânulo. Vê-se também as 4 classes de proteínas diferentes já encontradas na superfície dos grânulos, sendo elas: PHA polimerases, PHA depolimerases e Fasinas (Phap), que possuem a função de estabilização dos grânulos e proteínas com funções ainda desconhecidas, possivelmente como proteínas regulatórias, estruturais e enzimas que catalisam a formação dos grânulos (ZINN et al., 2001).

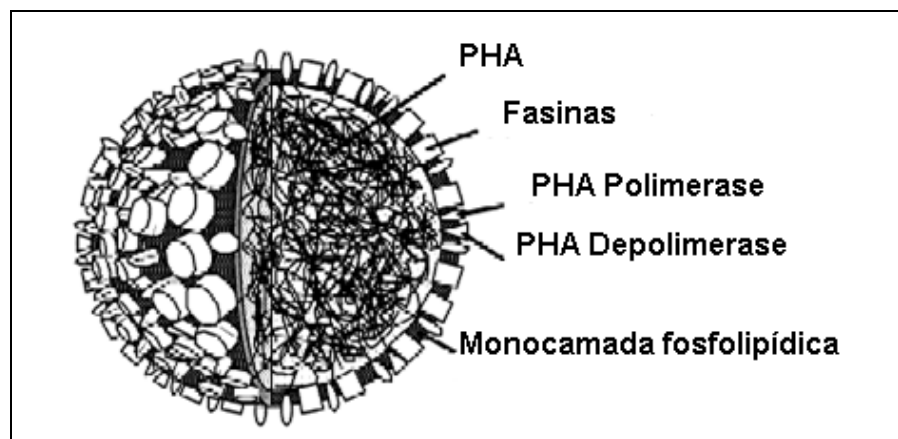


Figura 3 - Esquema do grânulo de PHB
 Fonte: ZINN et al., 2001, adaptado.

As Phap são proteínas não catabólicas, de baixa massa molar. Presume-se que estejam envolvidas na estabilização dos grânulos de PHA amorfos e hidrofóbicos, dentro de um citoplasma celular hidrofílico. Também estão envolvidas na formação intracelular dos grânulos, tamanho e quantidade. Há evidência que as Phap previnem que os grânulos de PHA individuais se juntem (SUDESH; ABE; DOI, 2000).

Para Jendrossek (2009), os grânulos de PHA, são uma complexa e organizada estrutura muito mais do que uma simples inclusão de polímeros, nessa estrutura estão presentes uma estrutura biosintética, catabólica, regulatória e também vários tipos de diferentes proteínas que estão relacionadas na superfície da membrana que os envolve.

Os grânulos de PHA estão envolvidos por uma membrana fosfolipídica. Sabe-se que ela pode estar envolvida na proteção como barreira que previne que os materiais dos grânulos entrem em contato com o citoplasma, evitando que o poliéster amorfo, em contato com a água, passe para uma forma mais cristalina (LUENGO et al., 2003). Em *A. eutrophus* H16, foi isolado uma proteína denominada de GA 24, que revelou ser a maior constituinte dos grânulos de PHA e está localizada na superfície da membrana que cerca os grânulos. Estudos relatam que estas proteínas afetam o tamanho e o número de grânulos nas células de *A. eutrophus* (WIECZOREK et al., 1995).

A grande maioria dos microrganismos acumuladores de PHAs estudados por microscopia tem células com diâmetro entre 0,4 a 1 μm , o que tem dificultado muito a determinação conclusiva da localização subcelular dos grânulos de PHA no início do estágio de formação (JENDROSSEK; SELCHOW; HOPPERT, 2007). Novos

estudos de acumulação e localização de P(3HB) em espécies com dimensões maiores, com intuito de facilitar a distinção da localização inicial da formação dos grânulos no periplasma ou no citoplasma celular, foram realizados com sucesso de verificação e localização. Na bactéria Gram positiva *Caryophanon latum*, que possui células de diâmetro de 2 a 4 µm foi constatado que o início do estágio de formação dos grânulos de P(3HB) é, frequentemente, no periplasma celular (JENDROSSEK; SELCHOW; HOPPERT, 2007).

Biofisicamente os grânulos de PHB existem em duas diferentes formas, intracelular, *in vivo*, e extracelular, após morte ou rompimento celular. O intracelular, também chamado de grânulo nativo (nPHA), apresenta poliésteres em seu estágio amorfo e suas moléculas são móveis, cercadas por uma densa membrana. Esta membrana é sensível a estresse físico e químico. Os grânulos de PHA extracelulares, isolados com solventes químicos ou outros métodos que removem a membrana que os envolve, são parcialmente cristalinos, com grau de cristalinização de 50 % - 60 % (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002; JENDROSSEK, 2007; UCHINO et al., 2007).

A análise por microscopia de fluorescência no início do estágio de acumulação dos grânulos de PHA de *R. rubrum*, *R. eutropha* e *E. coli* recombinante revelaram células com 1 ou 2 grânulos de PHB próximos dos pólos celulares. Outros microrganismos estudados, como *Xanthobacter autrophicus* e *Caryophanon latum*, também apresentavam grânulos próximos dos pólos; já em *Pseudomonas oleovorans* e *Bacillus* sp., não foi encontrado este padrão. Aparentemente, a iniciação da formação dos grânulos de PHA pode ser diferente para cada microrganismo em diferentes classes de PHA sintases (JENDROSSEK, 2005). Em estudos com *Beijerinckia indica* foi confirmado a presença de 2 grânulos de PHB, um em cada pólo celular, embora algumas células apresentassem um terceiro grânulo, no centro da célula bacteriana (BECKING, 1992).

Investigações com MET em *W. eutropha* H 16 mostraram células no início do estágio de formação de PHB, revelando elementos mediadores próximos ao centro celular rodeados por pequenos grânulos de PHB. Estes elementos mediadores parecem funcionar como sítio de iniciação da formação dos grânulos de PHB (STUBBE et al., 2005).

Alguns estudos com o uso de MET tentaram elucidar a estrutura da superfície dos grânulos de PHA, porém, os resultados são pouco conclusivos, possivelmente

devido à maneira pelo qual as amostras foram preparadas para caracterização, o que pode ter afetado sua estrutura (SUDESH et al., 2002).

No entanto, a MET continua sendo utilizada para verificação de acúmulo de PHAs, sendo eficiente para verificação do número e tamanho dos grânulos formados. A seguir pode-se observar as características visuais dos grânulos acumulados por diferentes bactérias, encontrados na literatura.

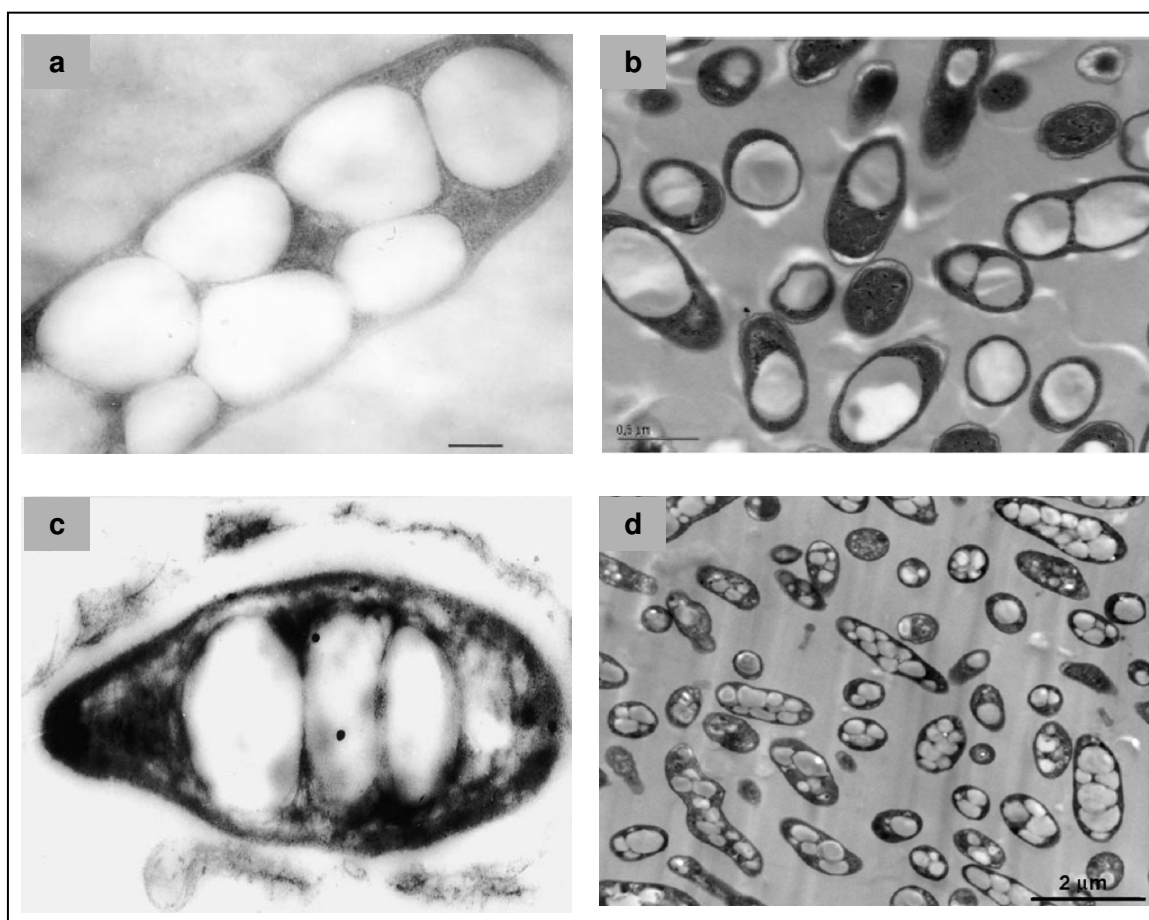


Figura 4 - Imagens de MET dos grânulos de PHA em diferentes bactérias: (a) *Ralstonia eutropha* H16- Fonte: POTTER et al., 2002 (b) *Halomonas boliviensis* LC1-Fonte: QUILLAGUAMAN et al., 2006 (c) *Bacillus megaterium* - Fonte: GOUDA; SWELLAM;OMAR, 2001(d) *Pseudomonas oleovorans* Fonte: Berlanga et al., 2006

A microscopia de força atômica (AFM) tem sido usada para estudar a estrutura da superfície dos grânulos de PHA (SUDESH et al., 2002). AFM, em um primeiro estudo, confirmou proteínas associadas aos grânulos de PHA bem como simples cristais de P(3HB). Esta visualização direta pode prover maiores entendimentos do mecanismo molecular de formação, mobilização e de regulação dos grânulos de PHA (SUDESH et al.,2004).

2.4 Aplicações

Os PHAs, por serem termoplásticos naturais biodegradáveis, podem ter inúmeras aplicações, em vários segmentos da indústria. Para a área médica, de forma geral, são produzidos fios de sutura, seringas, pinos cirúrgicos. Estes polímeros devem ser biodegradáveis, compatíveis e possuir elevado grau de qualidade. Na área farmacêutica, são usados em microencapsulamento de medicamentos e dispositivos para liberação controlada de medicamentos e devem possuir as mesmas características dos utilizados na área médica. Na indústria de alimentos, o maior uso é para confecção de embalagens descartáveis como copos, talheres plásticos. Para estas finalidades a característica mais importante é a biodegradabilidade. Também na produção de cosméticos tem se intensificado o uso de embalagens rígidas e há ainda muitas outras aplicações industriais, como matrizes biodegradáveis para liberação de inseticidas e herbicidas (HOLMES, 1985; GOMES; BUENO NETTO, 1997; BRANDL et al, 1988; SAVENKOVA et al., 2001; ORTEGA FILHO, 2003; SQUIO; ARAGÃO, 2004; REDDY et al., 2003; JOSÉ et al., 2006; BUCCI; TAVARES; SELL, 2007; MARTINS et al., 2008; VANZIN, 2008).

Recentemente, além das aplicações já conhecidas na área médica, outros produtos importantes de materiais biodegradáveis, têm sido desenvolvidos como implantes ósseos, vasos sanguíneos, válvulas para o coração e suportes para tecidos (SHRIVASTAV et al., 2010). Observou-se o desenvolvimento de novos sistemas de liberação controlada de fármacos (CARMIGNAN et al., 2008). O principal requerimento para fabricação de sistemas de liberação de drogas de ação prolongada é a viabilidade dos materiais apropriados. Estes materiais devem ser absolutamente inofensivos ao organismo e possuírem propriedades biomédicas compatíveis como tolerância pelos tecidos, sem qualquer ocorrência de inflamação, formação de abscesso ou necrose e ainda devem incluir degradabilidade em meios biológicos (WILLIAMS; MARTIN, 2002; SHISHATSKAYA et al., 2008). Os PHAs são biocompatíveis, não sendo tóxicos ao corpo humano; sua degradação produz o ácido 3-hidroxibutírico, o qual é um constituinte normal do sangue humano (ASRAR; HILL, 2000). Estudos demonstraram que eles podem ser administrados oralmente ou como suplementos alimentares na forma de oligômeros ou seus derivados 3-hidroxiácidos como 3-hidroxibutirato. Podem ser utilizados no controle de ataque

epiléptico, tratamento de diabetes, redução do catabolismo das proteínas, e desordens neurodegenerativas, aumento da eficiência cardíaca e doenças metabólicas (CHEM; WU, 2005).

Somente bem recentemente tem sido reconhecido que os grânulos de PHA podem ser considerados como bionanopartículas naturais. Tem se realizado estudos para explorar a estrutura dos grânulos de PHA. Uma grande variedade de moléculas e outras proteínas diferentes foram encontradas associadas à superfície da membrana que envolve os grânulos de PHA. Essas bionanopartículas podem ser descritas como uma estrutura de núcleo com poliésteres hidrofóbicos rodeados por uma membrana constituída de fosfolipídios e proteínas específicas. Numerosas ferramentas metabólicas são disponíveis para o controle da composição dos poliésteres e desse modo as propriedades do material dos grânulos de bionanopartículas (REHM, 2005). Com isto um novo interesse surgiu sobre as nanopartículas associadas aos grânulos de PHA, com grande potencial a serem desenvolvidos para aplicações em biotecnologia e biomedicina, de purificação de proteínas para liberação de drogas, biomateriais e biosensores (GRAGE et al., 2009).

Os PHAs têm sido considerados uma alternativa aos plásticos petroquímicos, não somente pelo seu principal atrativo, a biodegradabilidade, mas também por ser termoplástico e biocompatível (CHEM; WU, 2005). Com a crescente preocupação com a poluição ambiental, uma atenção especial esta sendo dada aos polímeros produzidos através de fontes renováveis e que podem ser compostados, reciclados ou ainda biodegradados (SIRACUSA et al., 2008).

Modificações químicas introduzidas nas estruturas dos PHAs parecem ser um caminho para se obter materiais com propriedades e características específicas, com potencial aplicação em diversas áreas (Colin, 2008).

2.5 Microrganismos produtores

A diversidade de microrganismos é de grande importância para o desenvolvimento de biotecnologias, que abrange diversas aplicações, como: a produção de compostos químicos (etanol, ácido acético, biogás, plásticos biodegradáveis, bioconversões na indústria de alimentos e farmacêutica, etc); produtos para agricultura (bioinseticidas, inoculantes agrícolas, etc), enzimas para diversos setores industriais, com destaque para a indústria de detergentes e

alimentícia; compostos de interesse médico e veterinário (antibióticos, antitumorais, hipocolesterolêmicos, imunossupressores, inibidores enzimáticos, antiparasitários, etc), citando alguns exemplos (BARNUM, 1998). Mesmo quando se trata exclusivamente da área específica de bioplástico, sendo a produção e qualidade dos PHAs dependentes do microrganismo, a diversidade dentre estes é fundamental para obtenção de polímeros com características distintas. O microrganismo, só após ser adequadamente identificado e avaliado quanto à presença de atributos desejáveis, como capacidade de síntese e acúmulo de PHAs, pode então ser usado para chegar ao desenvolvimento de um processo ou produto comercial (BULL et al., 2000). Por esta razão é fundamental formar e manter preservadas coleções de bactéria, só desta forma, pode-se bioprospectar grande parte da biodiversidade existente e assim garantir um fornecimento de subsídios para o desenvolvimento de biotecnologias como os bioplásticos. O Brasil vem sendo considerado um dos doze países com megadiversidade, os quais juntos concentram 70% da diversidade biológica do planeta (ComCiência, 2001), o que poderá garantir para o país uma posição segura em relação ao desenvolvimento dessas tecnologias dependendo, portanto, de investimentos nessa área.

Na literatura são reportados mais de 300 microrganismos capazes de sintetizar PHAs, mas somente uma pequena parte é empregada para a produção e desenvolvimento de processos, incluindo *Azotobacter vinelandii*, *Alcaligenes latus*, *Cupriavidus necator*, vários isolados metilotrofos e as versões recombinantes de *Cupriavidus necator*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes* (LEE, 1996). Outros microrganismos foram recentemente estudados tais como, *Bacillus spp*, *Pseudomonas spp*, *Aeromonas hydrophila*, *Rhodopseudomonas palustris*, *E.coli*, *Burkholderia sacchari*, *Halomomas boliviensis* (VERLINDEN et al., 2007). Com o avanço recente da biotecnologia, engenharia genética e técnicas moleculares têm sido desenvolvidos microrganismos recombinantes e mutantes, capazes de utilizar varias fontes de carbono e acumular grande quantidade de polímero melhorando assim a produção de PHA (LI, R.;Zhang,H.; Qi,Q ,2007). Já foram identificados mais de 75 gêneros diferentes de bactérias Gram positivas e negativas, capazes de acumular intracelularmente PHAs, algumas destas, podendo atingir níveis de até 90% de seu peso celular seco (MADISON; HUISMAN, 1999). No entanto a maioria das bactérias acumulam uma pequena percentagem de PHA de 1% a 15% mas em condições especiais de crescimento e estratégias de fermentação, podem alcançar

valores próximos a 90% de sua massa celular seca (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005). Por esta razão a seleção do microrganismo para produção industrial de PHA é baseada em vários fatores como, alta velocidade de crescimento, alta capacidade de síntese do polímero, utilização de vários substratos diferentes e de baixo custo, capacidade de acumular grande quantidade de polímero (LEE, 1996).

As bactérias que acumulam PHAs podem ser divididas em dois grupos, quanto às condições de cultivo requeridas para a síntese. No primeiro grupo não há necessidade de limitação de nutrientes essenciais ao seu crescimento e com excesso da fonte de carbono são produzidos os PHAs, como representantes deste grupo podem ser citados: *Alcaligenes latus*, uma linhagem mutante de *Azotobacter vinelandii* e *E. coli* recombinante, os quais podem acumular o polímero durante a fase de crescimento. O outro grupo, que necessita da limitação de um nutriente essencial para seu crescimento, e do excesso da fonte de carbono, esse grupo é representado por: *A. eutrophus*, *Protomonas extorquens*, *Pseudomonas oleovorans* (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005).

Na Fig. 6 é apresentado um esquema do acúmulo de PHA por *Cupriavidus necator* onde a síntese ocorre em duas etapas. Na primeira fase de multiplicação celular sendo então desejável que se obtenha uma fase inicial com grande geração de biomassa bacteriana, com mínimo acúmulo de polímero. Já na segunda fase, há de acúmulo de polímero, ocorrendo à limitação de um nutriente e um excesso da fonte de carbono, favorecendo a produção de PHA (FORMOLO et al.,2003).

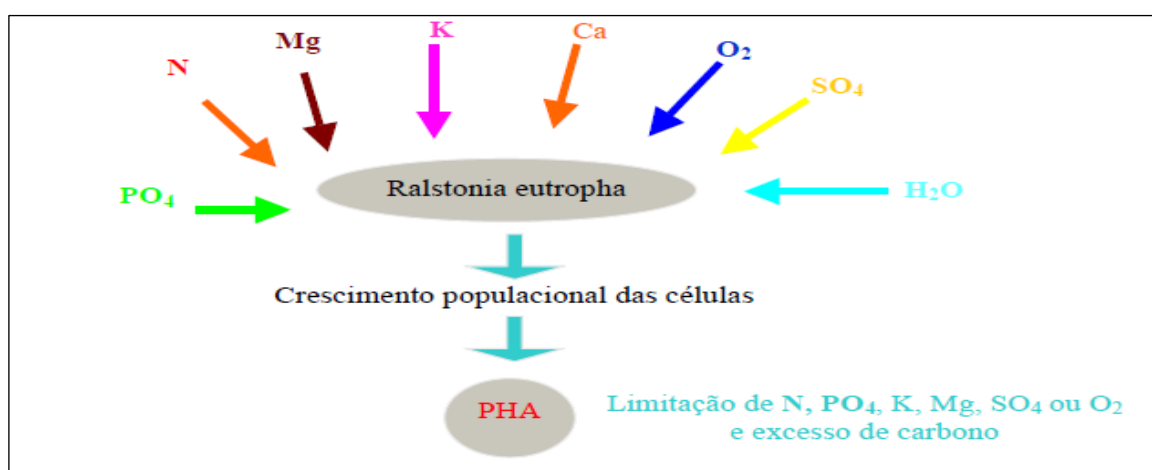


Figura 5- Esquema de limitação nutricional para a produção de PHA.
Fonte: FORMOLO et al.,2003.

2.5.1 *Beijerinckia* sp.

As bactérias do gênero *Beijerinckia* são fixadoras de nitrogênio, apresentam bastonetes Gram negativos, crescem a uma faixa de temperatura de 10 a 37°C, possuem bom crescimento com glicose. Representantes deste gênero são, quimioheterotróficos, podendo crescer em solos ácidos (pH 3,0 e 4,0) (DOBEREINER, 1958,1959 e 1997; BECKING, 1961 e 1992).

As Bactérias do gênero *Beijerinckia* já foram identificadas em solo de diversas partes do mundo, Indonésia por Derx (1950), Austrália por Tchan (1953), Canadá por Anderson (1966), Brasil por Dobereiner; Ruschell (1958).

Vários estudos têm reportado bactérias do gênero *Beijerinckia* e sua habilidade de acumularem P(3HB); Tchan (1953) isolou e classificou uma nova espécie de bactéria, a *Beijerinckia derxii* que produzia uma grande quantidade de P(3HB). Segundo Becking (1992) bactérias do gênero *Beijerinckia* são conhecidas por acumularem P(3HB). Podendo serem constituídas de até 35% de grânulos de P(3HB) (BECKING.,1961). Haywood et al. (1989) observou que bactérias do gênero *Beijerinckia* acumulavam 20% (p/p) de P(3HB) utilizando glicose como fonte de carbono; Stockdale, Ribbons e Dawes (1968) também relataram a presença de P(3HB) em algumas linhagens de *Beijerinckia*; e recentemente Jendrossek, Selchow e Hoppert (2007) reportaram a formação de grânulos de P(3HB) em *Beijerinckia indica*. No entanto, não se conhece ainda produção industrial de P(3HB) utilizando *Beijerinckia*.

Segundo o manual de Bergey's (1984), as bactérias do gênero *Beijerinckia* também produzem polissacarídeos extracelulares com diferentes composições dependendo da espécie.

2.6 Bioprospecção

Com o desenvolvimento da biotecnologia, e crescente interesse industrial na busca de novos produtos, principalmente os farmacológicos, tem surgido no mundo uma nova maneira de exploração dos recursos naturais e biológicos, a bioprospecção que de um modo amplo consiste na identificação, avaliação e exploração sistemática e legalmente de material biológico encontrado na natureza para a obtenção de novos produtos ou processos. A bioprospecção tem como

principal objetivo a busca de recursos genéticos e bioquímicos para fins comerciais (ARTUSO, 2002), sendo uma atividade ancorada em um conjunto de conhecimentos e práticas que emergem com o desenvolvimento econômico e do conhecimento técnico e científico (TRIGUEIRO 2006).

Existem vários conceitos de bioprospecção na literatura, sua grande maioria discursa sobre o potencial econômico da biodiversidade, portanto a prática da bioprospecção tendo implicações comerciais.

Segundo Torres (2009) nos países em desenvolvimento a bioprospecção tem se transformado em aumento no desenvolvimento de pessoal e tecnológico, países como a Colômbia atualmente apresenta uma grande porcentagem de suas pesquisas concentrada na área acadêmica cujo principal objetivo é a geração e fortalecimento de centros de pesquisas do país. Embora estas pesquisas que aplicam o conceito bioprospectivo têm como principal foco o desenvolvimento acadêmicos, isto não significa que em médio ou longo prazo os resultados não possam ser comercializados (LIMA, 2007).

No Brasil a bioprospecção é definida, pela Medida Provisória nº 2.186-16/01, como sendo a “atividade exploratória que visa identificar componente do patrimônio genético e informação sobre conhecimento tradicional associado, com potencial uso comercial” (art.7º, inc. VII).

A Medida Provisória nº 2.186-16/01, define, Conhecimento Tradicional Associado, como sendo, “informação ou prática individual ou coletiva de comunidade indígena ou de comunidade local, com valor real ou potencial, associada ao patrimônio genético”. (art. 7º, II). E o acesso ao conhecimento tradicional é definido como sendo a “obtenção de informação sobre o conhecimento ou prática, individual ou coletiva, associada ao patrimônio genético, de comunidade indígena ou de comunidade local, para fins de pesquisa científica, desenvolvimento tecnológico ou bioprospecção, visando sua aplicação industrial ou de outra natureza” (art.7º. inc. V). Enquanto que acesso ao patrimônio genético é a “obtenção de amostra de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica, desenvolvimento tecnológico ou bioprospecção, visando a sua aplicação industrial ou de outra natureza” (art. 7º, inc.IV).

2.7 Produção de Polihidroxialcanoatos (PHAs)

No Brasil a produção biotecnológica de PHAs teve início na década de 90. Um projeto conjunto entre o Instituto de Ciência Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), o Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo (IPT), e o Centro de Tecnologia da Copersucar contando com apoio do Ministério da Ciência e Tecnologia deu início as pesquisas de produção de P(3HB) a partir de cana de açúcar e seus derivados. O grupo do (IPT) foi liderado inicialmente por Celso Lellis Bueno Netto, e mais tarde por Geraldo Pradella, inclui José Gregório Gomez, Marilda Keico Taciro, Luiziana Ferreira da Silva e o engenheiro Carlos Rossell da Copersurcar, e este grupo foi o apoiador científico dos projetos de implantação da planta piloto no interior de São Paulo. Em 1995 foi instalada a primeira planta piloto, na Usina da Pedra, em Serrana, Estado de São Paulo para produção de P(3HB) e seu copolímero P(3HB-co-3HV). Na primeira fase foram realizados testes para mudança de escala da laboratorial para industrial. A capacidade de produção era de 1,5 a 2,0ton/mês. No ano 2000 a planta piloto foi remodelada e os processos adequados então foi criada a empresa PHB Industrial S/A, operando com uma maior capacidade de 50-60ton/PHB/a, e recebeu o nome comercial de Biocycle® (FORMOLO et al., 2003b; PACHIONE, 2004). Segundo pesquisadores do IPT, para cada 3 quilos de açúcar utilizado para alimentar as bactérias é possível obter 1 quilo de plástico.

No Brasil o PHB era produzido a cerca de U\$ 5,00 Kg⁻¹ em uma instalação de 50ton/a, custo esse bem menor que seus concorrentes internacionais, em parte pela fonte de carbono utilizada para sua produção, cana-de-açúcar. Em 2009 o custo foi reduzido para U\$ 4,5 Kg⁻¹ (PHB INDUSTRIAL S.A). No mercado internacional a produção PHB pela Metabolix (USA) 50.000 ton/a com nome comercial de Mirel®, produziu a um custo de €10 a 12 por Kg em 2004 e a U\$ 4,4 em 2008 (CASTILHO et al., 2009). O equivalente na Inglaterra custa US\$ 14. Na Alemanha em uma pequena escala comercial é produzido PHB para aplicações especiais, produtos médicos, com nome de Biomer®, normalmente pelas especificações exigidas para essa área, o custo é bem superior aos utilizados para embalagens plásticas para alimentos. No Japão a produção comercial tem a denominação de Biogreen® (MGC, 2010).

O potencial dos biopolímeros ainda é grandemente dependente de seu preço e de possíveis desenvolvimentos de processos tecnológicos mais econômicos

para seu processamento. O maior desafio dos PHAs é a redução dos custos de produção, que comparado com os plásticos petroquímicos ainda é elevado (CASTILHO et al., 2009). Sua produção e comercialização são dificultadas pelo alto custo de produção quando comparados aos plásticos petroquímicos. O quilo do PP custa no Brasil em torno de U\$ 1,7 (ICI, 2008) e o do P(3HB) é U\$ 4,5 (PHB INDUSTRIAL S.A., 2009).

2.7.1 Fatores que afetam os custos de produção de PHAs

A redução dos custos de produção dos PHAs depende da obtenção de linhagens altamente eficientes na conversão dos substratos no produto desejado, de utilização de substrato de baixo custo, do desenvolvimento de processos que permitam explorar ao máximo o potencial dessas linhagens e o desenvolvimento de processos de extração e purificação. Nos últimos anos uma nova linha de pesquisa tem buscado a redução de custos através da modificação genética de microrganismos (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005).

2.7.1.1 Utilização de substratos de baixo custo

O custo do substrato é um fator que contribui grandemente para o elevado custo de produção dos PHAs, representa cerca de 40% do custo total (KIM, 2000). Alguns substratos brutos podem ser utilizados para produção de PHA entre eles estão; cana de açúcar, beterraba, soro de leite, amido hidrolisado e óleos vegetais. Mas, geralmente, o conteúdo de polímeros e produtividade são inferiores dos obtidos com substratos de carbono purificados (LEE, 1996). Em relação às matérias primas disponíveis, no Brasil destaca-se a cana-de-açúcar que apresenta um grande potencial e competitividade, que juntamente com outras estratégias de produção podem levar a uma significativa redução dos custos (DIAS, 2008).

A tab. 2 apresenta exemplos de substratos de baixo custo, alguns são subprodutos industriais que são utilizados como fonte de carbono por diferentes microrganismos para produção de P(3HB).

Tabela 2 - Substratos de baixo custo utilizados para produção de P(3HB)

Microrganismo	Fonte de carbono	Conc. Celular (gL ⁻¹)	Conc. P(3HB) (gL ⁻¹)	Cont. P(3HB) (%)	Prod. (gL ⁻¹ h ⁻¹)
<i>A. chroococcum</i>	Amido	54	25	46	0,35
<i>A. chroococcum</i> H23	Amido	5,19	3,85	74,2	0,0535
<i>H. mediterranei</i>	Amido	10	6	60	-
<i>R. eutropha</i>	Tapioca hidrolisada	106	61	58	1,03
<i>E. coli</i> recombinante	Soro de leite	31	25	80	0,48
<i>E. coli</i> recombinante	Soro de leite	55	32	57	0,90
<i>Methylobacterium</i> sp. ZP24	Soro de leite	9,9	5,9	9,6	0,123
<i>B. cepacia</i>	Lactose	3,57	2	56	0,0167
<i>B. cepacia</i>	Xilose	-	-	48,8	-
<i>B. cepacia</i>	Xilose	2,59	1,55	60	0,0259
<i>P. pseudoflava</i>	Xilose	-	-	22	-
<i>A. vinelandii</i> UWD	Melaço	33	22	66	0,61

Fonte: Kim, 2000, adaptado.

2.7.1.2 Produtividade e conteúdo de PHA nas células

As avaliações econômicas mostraram que o aumento da produtividade, que é definida como a quantidade de polímero, PHA produzido por unidade de volume em uma unidade de tempo é o parâmetro fundamental para realização de transposição de escala com viabilidade econômica. A correlação é que para produzir uma mesma quantidade de PHA por ano, um processo com menor produtividade necessita de equipamentos maiores, aumentando os custos relacionados com equipamentos (CHOI; LEE, 1999). Quando comparados dois experimentos realizados com *E. coli* recombinante para produção de P(3HB) com produtividades diferentes, para uma planta de produção estimada em 1.000.000 ton a⁻¹, foi relatado o efeito da produtividade, quando a produtividade aumentou de 1,98gL⁻¹.h⁻¹ para 3,2gL⁻¹.h⁻¹ a avaliação dos custos de produção decresceu de U\$ 5,37 para U\$ 4,91Kg⁻¹ de P(3HB) (CHOI; LEE, 1999). Cultivos com altas densidades celulares e elevados rendimentos de conversão de substrato ao produto de interesse levam a uma alta produtividade (LEE et al., 2000). Vários autores têm desenvolvido pesquisas com cultivos a altas densidades celulares com alta produtividade com objetivo de redução dos custos de produção. Segundo Lee et al. (1997) o processo de produção de PHA para ser economicamente viável necessita de um cultivo com alta densidade celular

acima de 80gL^{-1} , com um conteúdo de biopolímero acima de 60% e alta produtividade de polímero, acima de $1\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$. Os cultivos com altas densidades celulares são geralmente necessários para se atingir uma alta produtividade por isso se utiliza cultivos em batelada alimentada (KOYAMA; DOI, 1995). Alguns autores têm reportado a produção de P(3HB) utilizando batelada alimentada com alta concentração celular, alto conteúdo de polímero e altas produtividades. Choi et al. (1998) obtiveram $194,1\text{gL}^{-1}$ de biomassa celular, $141,6\text{gL}^{-1}$ de P(3HB) a 73% de conteúdo de polímero a uma produtividade de $4,63\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$. Ryu et al (1997) obtiveram; 281gL^{-1} biomassa e 232gL^{-1} de P(3HB) com uma produtividade de $3,14\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$. Kim et al (1994) obtiveram um cultivo com 164gL^{-1} de concentração celular, 121gL^{-1} de P(3HB) correspondente a 76% do peso seco celular, com uma produtividade de $2,42\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Segundo Byrom (1987) o processo de produção industrial de P(3HB) pela METABOLIX e produção de P(3HB-co-3HV) pela Imperial Chemical Industries (ICI), vem utilizando cultivo em batelada alimentada conduzida em duas etapas, em todo processo segue com adição de fonte de carbono, até que se atinja uma quantidade desejável de polímero.

2.7.1.3 Processos de Extração e Recuperação de PHA

A biomassa bacteriana contendo o biopolímero após o cultivo geralmente é separada do meio de cultivo por centrifugação, filtração ou floculação. Em seguida na recuperação dos PHAs as células necessitam ser rompidas, podem ser utilizados vários métodos como; extração do polímero por solventes orgânicos, digestão com hipoclorito de sódio ou digestão enzimática (ZIN et al., 2001; PUNRATTANASIN, 2001). O método mais empregado para extração dos PHAs é através de solventes orgânicos como, clorofórmio, carbonato de propileno, diclorometano e dicloroetano, onde o biopolímero é solubilizado e posterior recuperação por precipitação em metanol ou etanol (LEE, 1996; ZIN et al., 2001). E como são necessários grandes quantidades de solventes cerca de 20 partes para 1 de polímero isso leva a um aumento significativo do custo (LEE, 1996a). No entanto, a recuperação do polímero utilizando solvente pode ser necessária quando se deseja uma alta pureza, pois este processo pode eliminar algumas endotoxinas presentes em algumas bactérias Gram negativas (JAQUEL et al., 2008).

Segundo Lee (1996) para que o processo de extração do polímero seja economicamente viável é necessário que o microrganismo seja capaz de acumular cerca de 60% de sua massa celular seca em biopolímero. A quantidade de biopolímero acumulado intracelularmente interfere na eficiência do processo de extração, no rendimento e na pureza. Dependendo do conteúdo de PHA, serão utilizadas maiores ou menores quantidades de solventes. Células com baixo teor de polímero necessitam de uma quantidade maior de produtos de digestão, o custo de recuperação do PHAs em relação ao custo total do processo pode chegar até 50% do valor do produto (LEE, 1996; LEE et al., 1988).

Dependendo do processo de extração empregado para recuperação dos PHAs poderá ocorrer modificações nas suas propriedades por degradação de sua massa molar (LING et al., 1997). O método baseado na digestão com hipoclorito de sódio relatado por Berger et al. (1998), pode causar degradação do biopolímero, podendo resultar em 50% de redução da massa molar e conseqüentemente perda de suas propriedades, o uso de surfactantes no entanto pode reduzir significativamente esta degradação (LEE, 1996a). Neste tipo de extração temos ainda o problema da dificuldade de eliminação completa de traços de hipoclorito do polímero, o que restringe seu uso (HEJAZI et al., 2003).

Outros métodos envolvem o uso de enzimas que, embora eficientes, resultam na elevação do custo final de produção. Diferentes processos de extração de PHAs são utilizados, porém o desenvolvimento de métodos eficientes tem que ser pesquisado para cada microrganismo empregado, pois é importante para a diminuição do custo total da produção de PHAs (CHOI; LEE, 1999).

O desenvolvimento de novas tecnologias e de processos fermentativos mais eficientes tem melhorado a competitividade do PHA, entretanto grande parte do custo ainda está associada ao processo de extração - separação dos biopolímeros (NASCIMENTO, 2001).

2.8 Técnicas empregadas na visualização e detecção dos grânulos de PHA

Os grânulos de PHB são acumulados por muitas espécies de bactérias. Este acúmulo pode ser detectado por vários métodos. A coloração com Negro de Sudão B é bastante empregada. As granulações lipídicas são lipossolúveis e insolúveis na água assim são utilizados corantes que tenha afinidade para os lipídios como é o

caso do Negro de Sudão B dando uma coloração azul muito escuro a preto (LELLIOT; STEAD, 1987). A detecção dos grânulos de PHAs pode ser realizada utilizando um microscópio óptico comum (ANDERSON; DAWES, 1990).

Vários autores têm utilizado a coloração com Negro de Sudão B para detecção de possíveis bactérias produtoras de P(3HB); Kessler e Palleroni (2001); Khanafari, Sepahei e Mogharab (2006); Das, Chowdhury, Anwar (2005) realizaram uma seleção entre 15 bactérias com o intuito de isolamento, purificação e caracterização de polímeros biodegradáveis produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas*. Cortés et al. (2008) realizaram uma triagem de bactérias produtoras de P(3HB) em um ambiente marinho poluído (PIJUAN; CASAS; BAEZA, 2009).

A Microscopia Óptica (MO) permite a análise de grandes áreas em curto espaço de tempo, além de ser de fácil utilização, rápida e pouco dispendiosa, os melhores microscópios ópticos têm um poder de resolução de 0,2 micrômetros, ou aproximadamente 200 nanômetros e aumentam a resolução do olho nu em 500 vezes (RAVEN et al., 1996).

O microscópio eletrônico permite o estudo minucioso e pormenorizado da estrutura da célula, devido ao seu enorme poder de resolução, bastante superior ao microscópio óptico. O MO proporciona um aumento de 500 vezes e o MET cerca de 500.000 vezes, aumento este necessário para observação de morfologia interna de células. Atualmente o uso de MET esta sendo bastante empregado no estudo de compostos poliméricos, tais como P(3HB) e seus copolímeros (CANEVAROLO, 2007).

Após a coloração com Negro de Sudão B os grânulos de P(3HB) e PHA não podem ser diferenciados por meio de simples observação, ou por MET. Estes métodos são utilizados para identificar a presença de PHAs, análises químicas são frequentemente necessárias para identificar e determinar a composição monomérica dos PHAs. A Cromatografia Gasosa (GC) é largamente empregada com o propósito de análise quantitativa e composição percentual dos biopolímeros (LAGEVEEN et al., 1988; TIMM; STEINBUICHEL, 1990; SUDESH; AB; DOI, 2000; QUIANG et al., 2001).

2.9 Identificação e Caracterização de P(3HB)

O processo de formação dos poliésteres por microrganismos tem despertado grande interesse, especialmente pelo potencial de suas aplicações. Estes PHAs pertencem a uma grande família de diferentes poliésteres, com mais de 91 unidades monoméricas já identificadas e suas propriedades dependem de sua composição monomérica; assim, têm-se uma diversidade de polímeros que possibilitam diversas aplicações devido suas características específicas (STEINBUCHEL; VALENTIN, 1995). É evidente a importância de se determinar a composição monomérica, identificando e caracterizando estes PHAs. Algumas etapas do processo de produção dos PHAs podem influenciar nas propriedades finais do polímero (NASCIMENTO, 2001).

Várias técnicas de identificação e caracterização de polímeros têm sido utilizada; as técnicas espectroscópicas incluem Espectrometria de Massas, Espectrometria de Ressonância Magnética, Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) e Raios-X. Outras técnicas como microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura, aplicadas para estudar a morfologia do material, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de força atômica. Por serem compostos orgânicos, suas características físicas e químicas são fortemente influenciadas pela temperatura, então análises térmicas podem ser empregadas como: Termogravimetria (TG/DTG), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) (SILVERTEIN et al., 2007; CANEVAROLO et al., 2007).

O método mais comum e disponível até o presente momento para análise de PHAs em células bacterianas é Cromatografia Gasosa (CG). Este método envolve metanólise ou propanólise dos PHB presentes nas células, na presença de ácido sulfúrico e clorofórmio diretamente sem extração prévia do PHB e subsequente conversão em metil ésteres os quais podem ser analisados por CG. Esta técnica se caracteriza pela alta precisão e excelente reprodutibilidade permitindo determinações abaixo de 10^5 gL^{-1} (BRAUNEGG et al., 1978; RIIS; MAI, 1988).

2.9.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

O espectro de absorção no infravermelho é hoje um dos métodos mais rápidos para caracterizar os grupamentos funcionais de um composto químico (COSTA NETO, 2005). Embora moléculas simples possam produzir espectros

extremamente complexos, a comparação de um espectro de um composto desconhecido com o de uma amostra conhecida, correlacionando as bandas constitui boa prova de identidade, visto ser muito pouco provável que dois compostos diferentes tenham o mesmo espectro de infravermelho, exceto se as substâncias forem enantiômeros (SILVERSTEIN, et al 2007). Apesar do espectro de infravermelho ser característico de toda molécula, certos grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independente da estrutura da molécula. É justamente a presença destas bandas características de certos grupos funcionais que permite, através de simples conferência do espectro e consulta a tabelas de informações de estruturas, a identificação de estruturas (SILVERSTEIN et al., 2007).

As características mais importantes de um espectro no infravermelho são os valores das frequências de absorção da molécula (bandas), parâmetro fundamental para sua identificação ou para a interpretação do espectro, visando à caracterização de grupamentos funcionais nele presentes (COSTA NETO, 2005).

3 ARTIGO

Produção de Polihidroxibutirato: Bioprospecção de *Beijerinckia* sp., da coleção de bactérias do Laboratório de Biopolímeros do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) – UFPel

(Artigo científico formatado de acordo com as normas do periódico Polímeros - Ciência e Tecnologia)

Produção de Polihidroxibutirato: Bioprospecção de *Beijerinckia* sp., da coleção de bactérias do Laboratório de Biopolímeros do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) - UFPel

Claudio Fernando de Oliveira

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – CDTec/UFPel

Angelita da Silveira Moreira

Departamento de Ciência dos Alimentos – FAT e CDTec/UFPel

Claire Tondo Vendruscolo

Departamento de Ciência dos Alimentos – FAT e CDTec/UFPel

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Cx. Postal 354, 96010-900, Pelotas, RS - Brasil

Resumo: Com a inovação da introdução dos bioplásticos, o propósito deste estudo foi selecionar, dentre 7 cepas de *Beijerinckia* sp., da Coleção de Microrganismos do Laboratório de Biopolímeros do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), microrganismos potencialmente produtores de poli(3-hidroxibutirato). Foi realizada uma triagem utilizando teste colorimétrico de Negro de Sudão B para visualização de corpos lipofílicos através de microscopia óptica, tendo sido selecionadas 3 cepas; após, as cepas foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) para confirmação da presença de corpos lipofílicos; a cepa C31 foi selecionada em função do tamanho e número de grânulos apresentados. Foram então conduzidos cultivos em incubador agitador orbital, em 3 meios diferentes para produção do biopolímero, selecionando-se o meio F4. O polímero foi extraído utilizando Soxhlet e

posteriormente formado o filme polimérico por evaporação lenta. A identificação e caracterização do biopolímero foram feitas através de Cromatografia Gasosa e Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier. Os resultados obtidos para *Beijerinckia* sp. cepa C31 demonstram que esta possui potencial para produção industrial de poli(3-hidroxibutirato).

Palavras-chave: PHB, *Beijerinckia* sp., Microscopia, Biopolímero, FT-IR

Abstract: With the innovation of development of bioplastic, the purpose of this study was to select, among 7 strains of *Beijerinckia* sp., from the Microorganism Collection of the Biopolymer Lab from the Technological Development Center (CDTec) of the Federal University of Pelotas (UFPel), powerful microorganism that produce poly (3-hydroxybutyrate). It was performed a trial using Sudan Black colorimetric test to see the lipophilic bodies through optic microscopy, being 3 strains selected; afterwards, the strains were analyzed through transmission electronic microscopy (MET) to confirm the presence of the bodies, the C31 strain was selected due to its size and number of granules presented. Culture was performed in shaker, in three different means to the production of biopolymers, being selected mean F4. The polymer was extracted using Soxhlet and, afterwards, forming a polymeric film by slow evaporation. The polymer identification and characterization were realized through Gas Chromatography and Infrared Spectroscopy Fourier Transform. The results obtained for *Beijerinckia* sp., strain C31 showed that it has great potential for the industrial production of poly (3-hydroxybutyrate)

Keywords: PHB, *Beijerinckia* sp., Microscopy, Biopolymer, FT-IR.

Introdução

Os materiais plásticos vêm se acumulando no meio ambiente, devido sua baixa degradabilidade e descarte indevido causando graves problemas ambientais em todo mundo (KHANNA; SRIVASTVA, 2005). Em busca de microrganismos produtores de matéria-prima para plásticos 100% biodegradáveis, conhecidos como bioplásticos, foi realizada uma bioprospecção em cepas de *Beijerinckia* sp. da Coleção de Microrganismo do Laboratório de Biopolímeros, do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Os bioplásticos são polímeros que quando descartados no meio ambiente se degradam ao ataque microbiano em curto espaço de tempo, sob condições apropriadas do ambiente. Devem possuir propriedades físicas e químicas semelhantes aos plásticos convencionais, serem produzidos a partir de fontes renováveis de carbono e ainda serem biodegradados o mais rápido possível quando descartados no meio ambiente^[1]. Dentre os biopolímeros em desenvolvimento, estão os polihidroxialcanoatos (PHAs)^[2].

Os PHAs são termoplásticos, possuem propriedades físicas semelhantes ao polietileno e polipropileno^[3,4]. Possuem imensa variedade de aplicações, como em filmes de embalagens, material descartável, implantes ósseos, válvulas cardíacas, substituição de vasos sanguíneos^[5]. Eles compreendem uma grande classe de biopolímeros, sendo o mais conhecido o poli (3-hidroxiбутirato) P(3HB), que é sintetizado no citoplasma bacteriano como grânulos de reserva de carbono e energia, em muitas eubactérias e, também, em algumas arquea halofílicas, podendo acumular até aproximadamente 90 % (w/w) de sua massa celular seca^[6].

Vários estudos têm reportado bactérias do gênero *Beijerinckia* e sua habilidade de acumularem P(3HB); Tchan^[7] isolou e classificou uma nova espécie de bactéria, a *Beijerinckia derxii* que produzia uma grande quantidade de P(3HB). Segundo Becking^[8] bactérias do gênero *Beijerinckia* são conhecidas por acumularem P(3HB). Podendo serem

constituídas de até 35% de grânulos de P(3HB) ^[9]. Haywood et al.^[10] observou que bactérias do gênero *Beijerinckia* acumulavam 20% (p/p) de P(3HB) utilizando glicose como fonte de carbono; Stockdale, Ribbons e Dawes^[11] também relataram a presença de P(3HB) em algumas linhagens de *Beijerinckia*; e recentemente Jendrossek, Selchow e Hoppert^[12] reportaram a formação de grânulos de P(3HB) em *Beijerinckia indica*. No entanto, não se conhece ainda produção industrial de P(3HB) utilizando *Beijerinckia*.

Neste contexto este trabalho teve como objetivo bioprospectar cepas de *Beijerinckia* sp. possivelmente produtoras de poli (3-hidroxibutirato) ,utilizando de técnicas de coloração com Negro de Sudão B, microscopia eletrônica de transmissão para posterior produção, identificação e caracterização do biopolímero produzido através de Cromatografia Gasosa e Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier .

Experimental

Material e métodos

Microrganismos

Foram escolhidas para este estudo as cepas de *Beijerinckia* sp C31, T125, 7070, B52, B52A, AA9 e AA15A, da coleção de bactérias do laboratório de Biopolímeros, do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Estas bactérias foram liofilizadas e mantidas a -4 °C, como material de estoque.

Meios e condições de cultivo

Para o desenvolvimento do trabalho, inicialmente as 7 cepas foram reativadas por reidratação em meio YM (Yeast Malt) líquido^[13] durante 20 minutos e depois repicadas para meio YM sólido; após incubação a 28 °C por 24 h em incubador bacteriológico foram mantidas a 4 °C, sendo preservadas por repiques mensais em YM sólido, com a seguinte

composição, em g.L⁻¹: peptona 5 g, glicose 10 g, extrato de levedura 3 g, extrato de malte 3 g e Agar 25 g; para o meio líquido não foi utilizado Agar. Os meios foram ajustados para pH 6,6 e esterilizados por 20 min a 121 °C.

O cultivo das cepas para a detecção de corpos lipofílicos, por coloração com Negro Sudão B, seguida de Microscopia Óptica (MO), foi realizado nos meios YM sólido, com a composição descrita anteriormente, e YDC^[14], com a seguinte composição em g.L⁻¹: extrato de levedura 10 g, glicose 20 g, carbonato de cálcio 20 g e Agar 20 g. O pH do meio foi ajustado para 8,9; as condições de incubação foram 28 °C durante 24 e 48 h, para ambos os meios.

Para a avaliação da presença de grânulos lipofílicos por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) entre as cepas selecionadas pelo teste de MO, a produção foi feita em duas etapas, sendo a primeira para multiplicação celular (fase 1) e a segunda para acúmulo de grânulos lipofílicos (fase 2). Para a fase 1 foi utilizado o meio YM modificado por JEANES^[7], e novamente modificado por Oliveira^[15], que neste trabalho foi denominado F1, com a seguinte composição em g.L⁻¹: glicose 9 g, extrato de levedura 2,7 g, extrato de malte 2,7 g, peptona 4,5 g. Após ajuste do pH em 6,6, 160 mL do meio foram colocados em frascos erlenmeyers de 500 mL e esterilizados por 20 min a 121 °C. Os frascos foram inoculados com 40 mL de suspensão bacteriana, proveniente de cultivo em meio YM sólido durante 24 h. As condições de cultivo foram 30° C e 150 rpm por 24 h em incubador agitador orbital. Para a fase 2, 10 mL do cultivo obtido na fase 1, contendo 1-3.10⁷ Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC.mL⁻¹), foram transferidos assepticamente para erlenmeyers de 250 mL contendo 40 mL de meio F2 estéril, pH 6,6, com a seguinte composição em g.L⁻¹: glicose 40 g, uréia 3 g, KH₂PO₄ 0,90, Na₂HPO₄ 0,74, e 1 mL da solução de oligoelementos contendo, em g.L⁻¹: MgSO₄ 7H₂O 0,2 g, CaCl₂ 0,01 g, NaMoO₄ 0,005 g, ZnSO₄7H₂O 0,01 g, FeCl₃ 6H₂O

0,05 g. A fonte de carbono foi autoclavada separadamente, neste e nos demais meios utilizados para a fase 2. Os cultivos foram realizados em incubador agitador orbital, durante 24, 48 e 72 h a 30 °C e 180 rpm. Realizaram-se também avaliações por MET em células da cepa C31 cultivadas por diferentes tempos no meio F1, durante a fase 1, e nos meios F3 e F4, descritos posteriormente, durante a fase 2.

Para determinação da curva de crescimento celular da cepa C31 na fase 1, utilizou-se 160 mL de meio F1, inoculados com 40 mL de suspensão bacteriana ($4,2 \cdot 10^8$ UFC. mL⁻¹) e as condições de cultivo foram 30° C e 150 rpm. Retirou-se amostras nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 20, 22, 24, 36, 40, 44, 48, 54, 60, 72 h; para as quais realizou-se diluições seriadas com o plaqueamento feito por meio da técnica do espalhamento com alça de Drigalski. Para construção da curva, utilizaram-se as diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} , inoculadas em meio YM sólido e incubadas a 28 °C por 24 h; após procedeu-se a contagem. Os dados obtidos do número de UFC.mL⁻¹ em cada tempo foram plotados em gráfico para a obtenção da curva de crescimento.

O cultivo (fase 1 e fase 2) objetivando o acúmulo do polímero pela cepa C31 para posterior determinação do consumo de substrato (glicose), da produção de massa celular seca e de poli(3-hidroxibutirato) foi realizada utilizando-se o meio F1 para a fase 1; 200 mL do meio F1 com pH 6,6, previamente esterilizados, contidos em frascos erlenmeyers de 500 mL, contendo $2,1 \text{ UFC.mL}^{-1}$ nas condições de 30 °C, 150 rpm por 24 h. Para a fase 2 foram utilizados três diferentes meios: F2, descrito anteriormente; o meio V, descrito por Vendruscolo^[16], aqui denominado F3, com a seguinte composição em g.L glicose 40 g, extrato de levedura 0,2 g, triptose 2 g, MgSO₄ 7H₂O 2,7 g, KH₂PO₄ 2 g, K₂HPO₄ 13,62 g; o meio F4 com a seguinte composição em g.L⁻¹: glicose 40 g, uréia 3 g, ácido cítrico 0,2 g, citrato de sódio 4 g, e 1mL da solução de oligoelementos contendo: MgSO₄ 7H₂O 0,2 g, CaCl₂ 0,01 g, NaMoO₄, 0,005 g, ZnSO₄ 7H₂O 0,1 g, FeCl₃ 6H₂O 0,05 g. Os cultivos foram

realizados em frascos erlenmeyers de 2 L, contendo 80 mL do caldo obtido na fase 1, com 3.10^8 UFC.mL⁻¹, e 320 mL de meio F2, F3 ou F4; estes foram incubados em incubador agitador orbital a 30 °C e 180 rpm, até 72 h.

Para extração do poliéster e posterior formação de filme e identificação por FT-IR, foram utilizadas células cultivadas nas condições já descritas para a fase 1; na fase 2 utilizou-se o meio F2, durante 48 h nas condições já descritas acima para este meio. O pH do meio foi ajustado 6.6 antes de ser esterilizados a 121 °C por 20 min. A fonte de carbono, nitrogênio e tampão foram autoclavados separadamente.

Avaliação da presença de corpos lipofílicos

Microscopia óptica (MO)

A investigação prévia da presença de corpos lipofílicos nas 7 cepas estudadas foi feita por meio de coloração com Negro Sudão B, segundo Leliot, Stead ^[17]. Foi preparada uma solução hidroalcóolica [água: álcool 30:70 (v/v)] adicionada de Negro Sudão B (0,3% m/v). Esfregaços em lâminas de vidro, realizados a partir dos cultivos obtidos em placa de petri em 24 e 48 h e fixados em bico de Bunsen, foram imersos na solução hidroalcóolica por 10 min e, após, lavados com xilol, secos com papel absorvente, lavados com água e secos novamente. Em seguida, os esfregaços foram cobertos com safranina 0,5 % por 30 s e lavados com água corrente; as lâminas foram secas e examinadas em microscópio óptico, utilizando objetiva de imersão. Os grânulos lipofílicos apareceram como inclusões intracelulares negro-azuladas. Os resultados positivos para o Negro Sudão B foram avaliados por microscopia eletrônica de transmissão.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A utilização da MET objetivou a caracterização da quantidade e tamanho das inclusões lipídicas para os acessos previamente selecionados na microscopia óptica. Para esta análise foram utilizadas células com 24, 48 e 72 h de crescimento em três diferentes meios, lavadas duas vezes em solução salina 0,85 % (m/v) e recuperadas por centrifugação a 335 g por 10 min. Após, o material permaneceu uma hora em fixador (glutaraldeído 2 % e paraformaldeído 2 %) , diluído com tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2. Posteriormente a fixação, o material foi centrifugado, retirando-se o sobrenadante e ressuspensando-se por duas vezes em solução de cacodilato de sódio 0,05 % (m/v), pH 7,2, seguida de centrifugação 335 g de 15 min. As amostras foram pós-fixadas durante 1 h em solução de tetróxido de ósmio 1 % (m/v) e novamente centrifugadas a 335 g por 10 min; após, foram ressuspensas com H₂O bidestilada e centrifugadas novamente por 10 min. A seguir foram realizadas desidratações com álcool 30 % (v/v), 50 % (v/v), 70 % (v/v), 90 % (v/v), 95 % (v/v), sendo dois banhos de 5 min para cada concentração; para álcool P.A. e acetona P.A utilizaram-se 3 banhos de 10 min cada, respectivamente. Por fim as amostras foram incluídas em resina Epon® AB-DinP30 diluída em acetona (1:1 v/v), por 1 h sob agitação; após, o processo foi repetido utilizando-se resina pura; a seguir centrifugaram-se as amostras por 15 min a 335 g para remoção do sobrenadante e as amostras foram incluídas nos blocos, coberto por resina até a metade, durante 24 h; após, completou-se o volume, sendo o tempo de polimerização de cinco dias a 60 °C. Os cortes semifinos e ultrafinos foram observados em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss® EM900).

Métodos analíticos

Determinação da concentração de biomassa

A determinação da concentração celular das amostras ou Massa Celular Seca (MCS) foi realizada por gravimetria, onde 10 mL de cada caldo fermentado analisado foi centrifugado em tubos de 50 mL, previamente identificados e pesados, a 11.950 g por 20 min. O sobrenadante foi separado e o precipitado ressuspensão com 10 mL de solução salina 0,89 % e novamente centrifugado. O sobrenadante foi desprezado e o tubo contendo as células foi seco em estufa a 57 °C por 48 h. Após esse tempo, as amostras foram resfriadas em dessecador e pesadas.

Dosagem de glicose

A determinação da curva de concentração do substrato glicose (que inclui a glicose proveniente da hidrólise de exopolissacarídeo) foi realizada através do método do ácido 3-5-dinitrosalicílico (DNS)^[18], que determina a concentração de açúcares redutores. Após o preparo do reagente, um volume de 400 µL de sobrenadante, previamente diluído, foi adicionado a 400 µL de reativo DNS e depois colocado em banho-maria a 100 °C por 5 min. Após esse período, fez-se o resfriamento em banho de gelo e adicionou-se 4 mL de água destilada. Após 15 min em repouso para estabilização da temperatura, foi realizada a leitura espectrofotométrica a 540 nm contra um branco de água destilada que passou pela mesma reação. Foi realizada uma curva de calibração onde se expressa a concentração de glicose (g.L^{-1}) *versus* absorbância em uma escala compreendida entre 0 e 3 g.L^{-1} de glicose.

Identificação e determinação da concentração de Poli (3-hidroxibutirato)

A concentração de P(3HB) no caldo fermentado foi determinada por Cromatografia Gasosa (CG) através do método de metanólise proposto por Braunegg et al.^[19], com as

modificações propostas por Brandl et al.^[20]. Um volume de 40 mL de caldo fermentado dos tempos 24,48 e 72h foram centrifugados a 11.950 g e as células foram lavadas duas vezes com solução salina 0,89 %, sendo o precipitado congelado para posteriormente ser submetido à metanólise. Após descongelamento as células foram transferidas para tubos de ensaio com tampa de rosca, aos quais acrescentou-se 2 mL de metanol acidificado e 2 mL de clorofórmio. Para compor o metanol acidificado adicionou-se 15 % de ácido sulfúrico e 0,04 % de ácido benzóico, este último utilizado como padrão interno.

Os tubos de ensaio foram levados ao banho termostático a 100 °C, durante 1 h; decorrido este tempo, os tubos de ensaio foram retirados e agitados em agitador de tubos, voltando ao banho por mais 1 h e 20 min, quando foram retirados e a reação interrompida por banho de gelo. Após, acrescentou-se 1 mL de água ultrapura, agitando-se novamente no agitador de tubos durante 30 s para a formação de duas fases. Com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*, retira-se a fase orgânica, inferior, passando-a aos *vials* para a análise em Cromatografia Gasosa. A análise foi realizada em cromatógrafo gasoso Perkin Elmer® modelo Clarus 500 equipado com coluna capilar Carbovax (30 m x 0,25 mm) e detector de ionização em chama (FID). O gás de arraste usado foi nitrogênio (1 mL/min). A rampa de temperatura utilizada foi 60 °C por 2 min com aumento de 10 °C/min até atingir a temperatura de 200 °C, que foi mantida por 4 min. O volume injetado foi de 2 µL. O PHB de pureza analítica (Sigma Aldrich®) também, submetido à derivatização, foi utilizado como padrão. Para elaboração da curva de correlação, o padrão foi pesado de forma a se obter massas entre 0,001 e 0,04 g e submetido a metanólise.

Extração do P(3HB) e preparação do filme polimérico

A extração do biopolímero foi realizada utilizando o princípio de extração contínua tipo Soxhlet, empregando como solvente o clorofórmio. O período de extração foi de 7 h, onde 10 g de células liofilizadas da cepa C 31 foram utilizadas com 150 mL de solvente.

Após o processo de extração, os polímeros foram preparados na forma de filmes finos através do processo de evaporação lenta do solvente. Uma solução a 1 % (m/v) do polímero em clorofórmio foi mantida sob agitação constante durante 2 h. Após esse processo, a solução foi vertida em placas de petri e colocada dentro de uma cuba de vidro saturada com clorofórmio. Decorridas 48 h as placas contendo os filmes foram removidas e colocadas em estufa para secagem, conforme Schneider^[21].

Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para identificação do biopolímero produzido pela cepa C 31, foram preparadas pastilhas de KBr com o filme polimérico triturado, respectivamente. Para confecção das pastilhas, 2 mg de amostra foram misturadas com 200 mg de KBr. Para obtenção do espectro foi utilizado o espectrômetro IR com transformada de fourier Shimadzu® modelo IR Prestige 21. Foram adquiridas 64 imagens dentro de uma faixa de 4500-500 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1} .

Resultados e Discussão

Avaliação preliminar da presença de corpos lipofílicos

Microscopia óptica (MO) com Negro Sudão B

Para a avaliação preliminar da presença de corpos lipofílicos nas células foi realizada uma triagem com todas as cepas de *Beijerinckia* sp., através do teste Negro Sudão B. Este teste colorimétrico é específico para detectar corpos lipofílicos e pode mostrar a presença de granulações lipídicas no interior das células. O corante Negro Sudão B é ligeiramente solúvel em solvente orgânico como o álcool e insolúvel em água. Durante o processo de coloração atua por difusão simples, ligando-se às estruturas celulares hidrofóbicas, como os grânulos de PHAs, onde é mais solúvel que no meio alcoólico onde se encontrava solubilizado,

conferindo aos grânulos uma coloração negra, indicando resultado positivo, que possibilita que os mesmos possam ser visualizados em microscópio óptico^[17,22].

O meio YM é frequentemente utilizado em microbiologia^[13]; o meio YDC é tradicionalmente utilizado para identificação de bactérias produtoras de corpos lipofílicos^[22]. Para fins comparativos, foram utilizadas células com 24 e 48 h de incubação, para os dois meios.

Os resultados do teste de coloração com Negro Sudão B das células das 7 cepas e posterior visualização em microscopia óptica são apresentados nas Figuras 1 e 2.

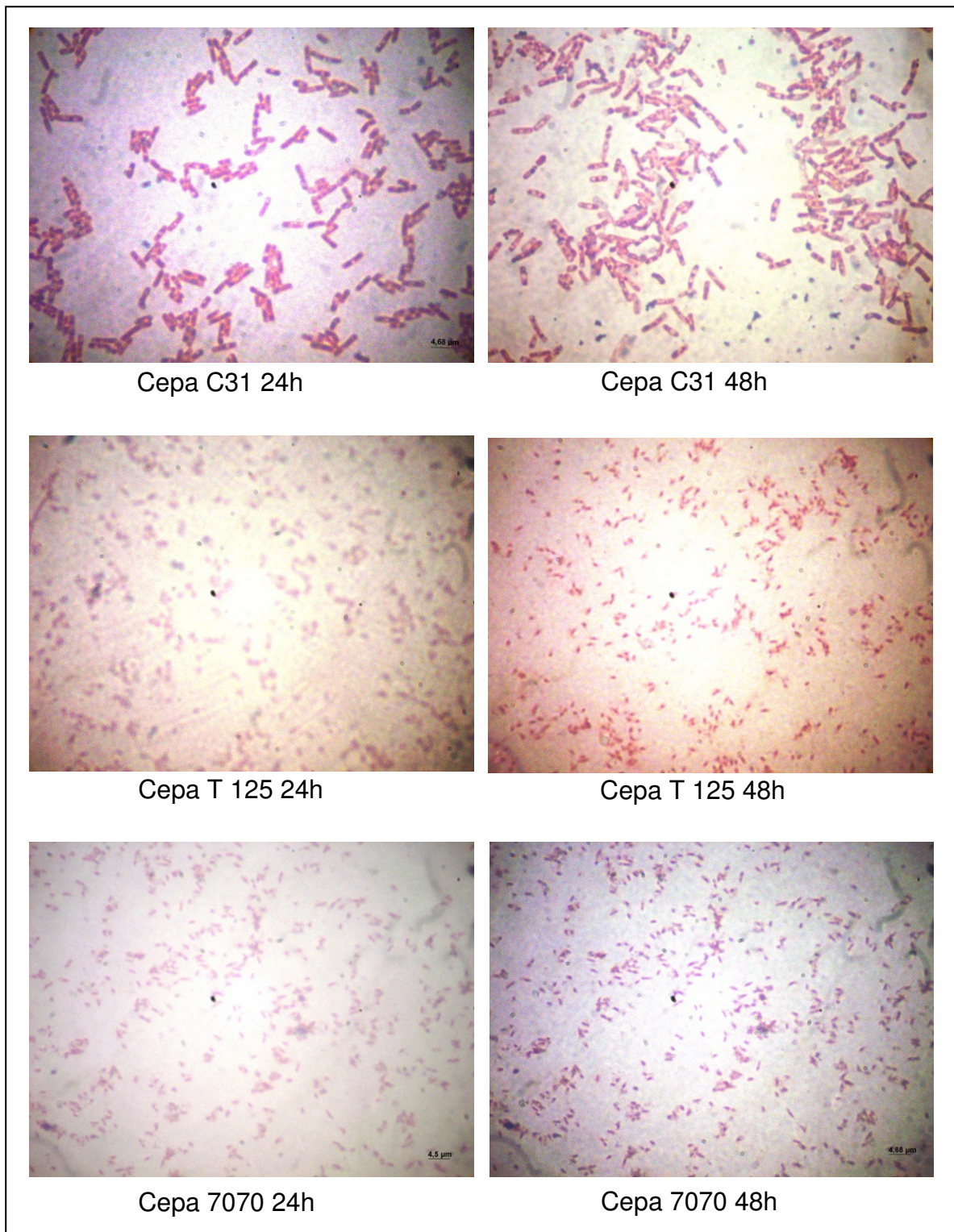


Figura 1. Microscopia óptica de células das cepas C31, T125 e 7070 cultivadas em meio YM durante 24 e 48 h, coradas com Negro de Sudão B. Objetiva de imersão aumento 1000x.

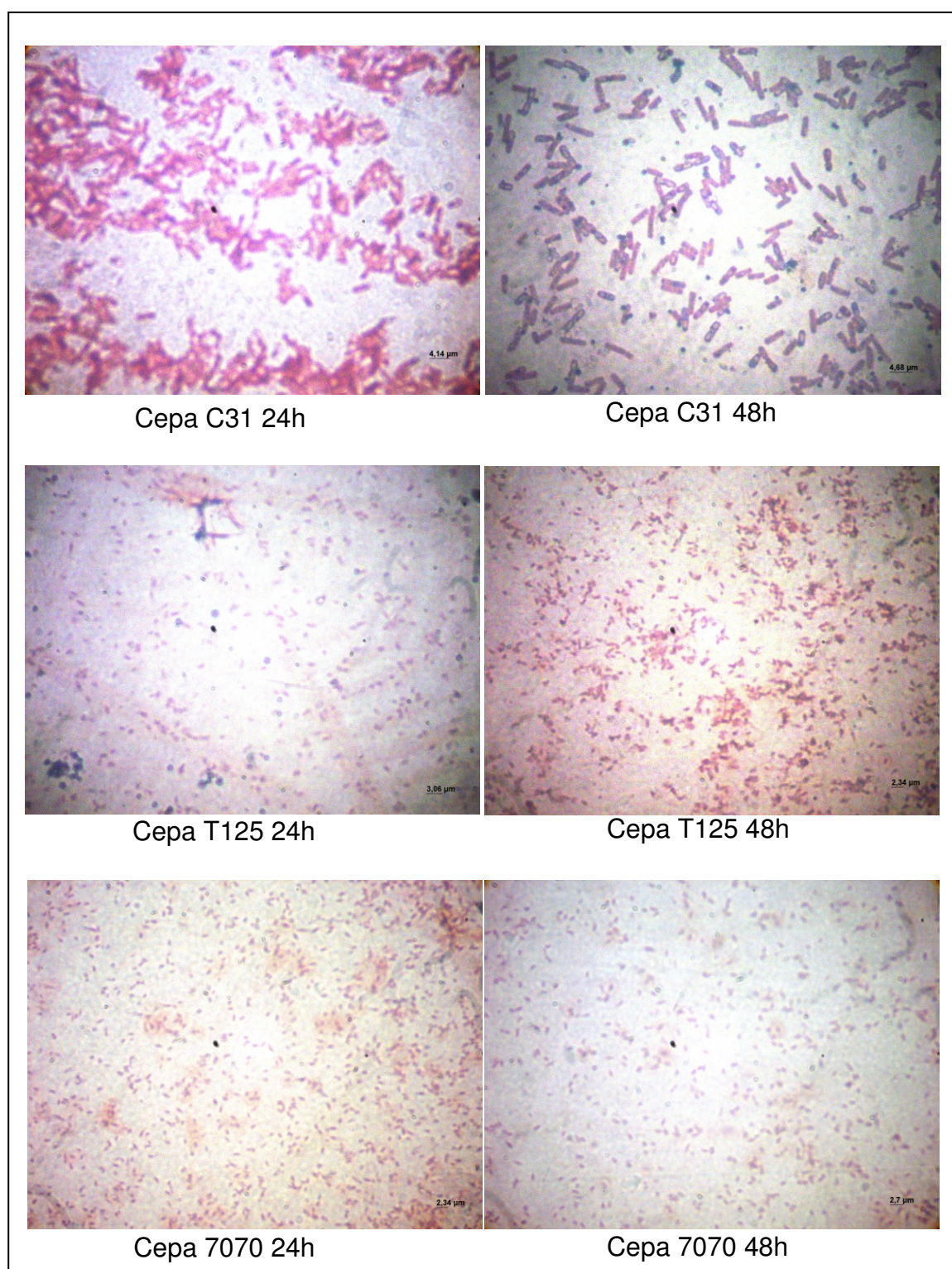


Figura 2. Microscopia óptica de células das cepas C31, T125 e 7070 cultivadas em meio YDC durante 24 h e 48 h, coradas com Negro de Sudão B. Objetiva de imersão aumento 1000x.

A Tabela 1 sumariza os resultados obtidos com o teste de coloração por Negro Sudão B.

Tabela 1. Resultados do teste Negro Sudão B para as sete cepas em YM e YDC sólido

Tempo de Incubação\ meio	Cepas						
	C31	T125	7070	B52	AA9	B52A	AA15A
24h/YM	+	±	±	-	-	-	-
48h/YM	+	+	+	-	-	-	-
24h/YDC	+	±	±	-	-	-	-
48h/YDC	+	+	±	-	-	-	-

Resultados positivos: pontos negros visíveis (+), pontos negros pouco visíveis (±).

Resultado negativo: pontos negros invisíveis (-).

Para a cepa C31 obteve-se resultados positivos para presença de grânulos lipofílicos nas células cultivadas em todas as condições testadas. Para a cepa T125, apesar ter-se obtido resultados positivos em todos os meios e tempos analisados, os grânulos foram mais bem visualizados nas células com 48 h de cultivo. Com a cepa 7070, embora tenham sido obtidos resultados positivos para todas as condições testadas, a melhor visualização dos grânulos lipofílicos foi obtida em células com 48 h de cultivo no meio YM. Já as cepas B52, B52A, AA9 e AA15A, nos dois meios testados, não apresentaram a coloração específica com o corante Negro Sudão B nos tempos analisados, indicando que estas bactérias não acumulam grânulos de reserva lipofílicos no seu interior nas condições testadas.

Comparando-se os resultados fica evidente que a cepa C31 é a mais promissora quanto à acumulação de grânulos lipofílicos. Nas cepas T125 e 7070, verificou-se dificuldade na identificação, através desta técnica, dos corpos lipofílicos intracelulares devido ao menor tamanho destes microrganismos, comparativamente à cepa C31. Como já mencionado, os grânulos de PHA variam de 0,2 a 0,5 μm de tamanho, que é somente um pouco menor que o diâmetro da maioria das espécies bacterianas, que fica em torno de 0,4 a 1 μm ^[12]. Nas demais cepas não foram observadas granulações positivas para o corante utilizado. Assim, foram selecionadas para a sequência da pesquisa as cepas C31, 7070 e T125.

Segundo Bergeys's^[23] e Stockdale et al.^[11], bactérias do gênero *Beijerinckia* são consideradas potencialmente capazes de produzir PHAs, que podem ser preliminarmente detectados pelo teste colorimétrico de Negro Sudão B. Pijuan, Casas e Baeza^[24] utilizaram a técnica de coloração de Negro Sudão B para identificar microrganismos com possível potencial para produção de PHA. Cortés et al.^[25] realizaram uma seleção de cepas produtoras de P(3HB) em sedimentos marinhos oriundos de descarte de resíduos de indústria de conserva de frutos do mar, utilizando a técnica de Negro Sudão B, obtendo micrografias indicando a presença de inclusões lipofílicas. A identidade das inclusões, P(3HB), foi confirmada por testes analíticos.

Observando-se as micrografias da cepa C31 (Figuras 1 e 2), vê-se que a grande maioria das células apresenta dois pontos negros, localizados um em cada pólo celular e, quando está presente um terceiro, localiza-se próximo ao centro da célula. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados com *Beijerinckia indica* que, no início do estágio de acumulação de polímero, mostrou 98% de células contendo dois grânulos de P(3HB) e algumas com três grânulos, sendo um em cada pólo e outro no centro da célula^[12]. Observação similar também foi realizada por Jendrossek^[26], que relatou que algumas bactérias, como *Xanthobacter autotrophicus*, *Caryophanon luttum*, *Rhodospirillum rubrum*, *Ralstonia eutropha* e *Escherichia coli* recombinante, também apresentaram o mesmo padrão de formação dos grânulos de PHA no início do estágio de formação; o autor sugeriu que um novo grânulo pode ser formado próximo ao local de formação do septo de divisão celular. Peters e Rehm^[27] corroboraram esta afirmativa. Também Jendrossek, Selchow e Hoppert^[12] afirmaram que célula com um terceiro grânulo no estágio inicial de formação de PHA poderia estar próxima da divisão celular. Aparentemente, o início da síntese de formação dos grânulos de PHA pode ser diferente em diferentes bactérias, dependendo das classes de PHA sintases que este microrganismo possui^[26].

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As cepas C31, 7070 e T125, que tiveram resultados positivos no teste de coloração com Negro Sudão B, para detecção de corpos lipofílicos, foram cultivadas, durante a fase 2 de produção, em meio F2, durante 48 h. Os resultados são mostrados na Figura 3. O meio F2, além de possuir vários oligoelementos, possui uma maior correlação carbono/nitrogênio (em relação a F1).

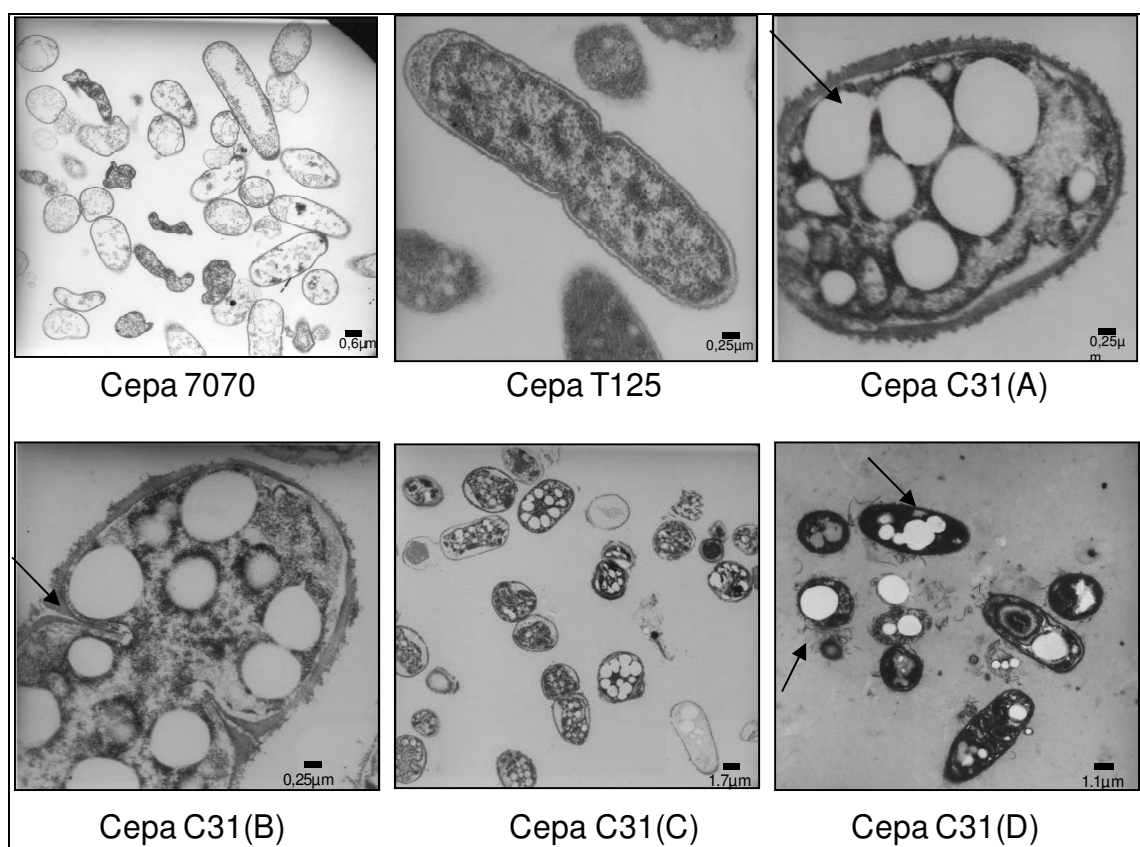


Figura 3- Fotomicrografia por MET utilizando meio F2 na fase de acúmulo de grânulos, após 48 h de cultivo.

Na Figura 3, observam-se resultados positivos para as três cepas. Entretanto, nas fotomicrografias das cepas 7070 e T125 podem ser vistos grânulos pequenos e difusos, principalmente na cepa T125, enquanto nas células da cepa C31 observam-se grânulos maiores e mais bem definidos (C31 A), corroborando os indícios observados pela coloração com Negro Sudão B em microscopia óptica. Tian et al.^[28] também relataram em seu estudo da cinética da formação dos grânulos de PHB em *Wautersia eutropha* H16 (atualmente

conhecida como *Cupriavidus necator*), utilizando MET, a presença de pequenas inclusões semelhantes às verificadas nas cepas 7070 e T125, nas condições testadas.

Nas diferentes fotomicrografias da cepa C31, Figura 3, observa-se a presença nítida de grânulos, que são reservas lipofílicas intracelulares, e que aparecem em MET como corpúsculos opacos elétron-densos (claros), o que é um forte indício de serem de P(3HB)^[25]. A quantidade de grânulos observados por célula, na Figura 3, variou de 1 a cerca de 12 (C31 C), podendo ser vistas células com um único grânulo grande ou vários grânulos de tamanhos variados, alguns chegando a medir 2,2 μm em células com 3,3 μm (C31 D); outros ocupam quase todo o espaço intracelular, mostrando que esta bactéria é capaz de acumular grande quantidade de corpos lipofílicos. Esta diversidade também foi relatada por Anderson e Dawes^[6], Tian et al.^[28] e Berlanga et al.^[29].

Alguns tipos de PHA, como o P(3HB), apresentam, segundo alguns autores, grânulos típicos^[30]. No presente estudo, pôde-se observar grande semelhança entre os grânulos presentes na cepa C31 e os grânulos de P(3HB) observados por Lugg et al.^[31], Jendrossek, Selchow e Hoppert^[12] e Tian et al.^[28]. Alguns autores defendem a idéia de que grânulos PHA com diferentes composições químicas apresentam diferentes morfologias e perfis numérico. Segundo Loo e Sudesh^[30], existem diferenças entre células de *Delftia acidovorans* com grânulos de P(3HB) que são mais numerosos (mais que 7) e menores, e aquelas células com P(3HB-co-3HV), cujos grânulos são maiores e menos numerosos por célula, segundo os autores ocupando quase o volume total da célula, no entanto isto não correspondeu a mais alta quantia de polímero por célula; os grânulos de P(3HB-co-3HV) foram menos denso do que P(3HB) e P(4HB), respectivamente. Em nosso estudo, no entanto, podemos observar uma heterogeneidade morfológica e numérica para as células da cepa C31 crescida em uma mesma condição. Nas fotomicrografias da cepa C31 pode ser observado que células que acumulam vários grânulos, 12, por exemplo, (C31 B e C31 C), apresentam geralmente 6 grânulos

maiores e 6 grânulos com tamanho aproximadamente dez vezes menor. Holmes et al.^[32] relataram que *Acaligenes eutrophus* possui de 08 a 12 grânulos de diferentes tamanhos, enquanto Klinke et al.^[33] mostraram que em *Pseudomonas oleovorans* geralmente possui 01 a 02 grandes grânulos; Chrochemore^[34] mostraram que em *Pseudomonas* degradadoras de agrotóxicos o número variou de 1 a 13 grânulos, porém sem grande variação de tamanho dentro da mesma célula. Segundo Luengo et al.^[35] e Rehm et al.^[36], geralmente os grânulos de PHAs possuem de 0,2 a 0,5 μm de diâmetro e variam em número de 1 a 13. Outros autores, como Anderson e Dawes^[6], dizem que a quantidade pode ter uma variação ainda maior, de 5 a 20 grânulos por célula e que o diâmetro pode variar entre 0,1-0,5 μm .

Outra observação importante registrada na Figura 3, na fotomicrografia da cepa C31(A), é o início da união ou coalescência entre dois grânulos adjacentes; na fotomicrografia cepa C31(D) observa-se uma célula com estado mais avançado de coalescência de grânulos. Tian et al.^[24] também reportaram a união de grânulos adjacentes em *Wautersia eutropha* H16, observados por MET. O tema coalescência de grânulos de PHA é controverso e tem sido discutido na literatura pertinente. Steinbuchel et al.^[37] sugeriram que a presença de fasinas na membrana dos grânulos de PHA preveniria a junção dos grânulos. Segundo Wieczorek et al.^[38], que isolaram uma fasina GA24 em *Alcaligenes eutrophus* H16 localizada na membrana que envolve os grânulos, esta proteína afetaria o tamanho e o número de grânulos de PHA na célula de *A. eutrophus*. Para Poter et al.^[39], as fasinas não são essências para a acumulação de PHA, mas linhagens incapazes de produzir qualquer tipo de fasina acumulam um grande e único grânulo de PHA, ocupando todo espaço disponível na célula; a super expressão de PhaP levaria à formação de vários pequenos grânulos. Em nosso estudo, contrariamente, observou-se simultaneamente os dois padrões descritos, único e volumoso grânulo e vários pequenos grânulos, em células da cepa C31 cultivadas sob mesma condição.

Na micrografia cepa C31(B), da Figura 3, pode ser observado uma célula bacteriana dividindo-se com o início da formação do septo. Como a célula filha possui, geralmente, cerca de metade do tamanho da célula mãe, após a divisão celular passamos a ter, proporcionalmente, duas células com grande quantidade de material lipofílico acumulado. Segundo Peters e Rehm^[23], os grânulos de PHA aumentam de tamanho, enquanto a atividade da PHA sintase continua ligada aos grânulos, mas ainda não foi determinado se os grânulos maiores são resultados da fusão entre grânulos adjacentes ou da continuidade da atividade polimerizante da PHA sintase.

Na micrografia da Cepa C31(D), Figura 3, observa-se que as bactérias, quando acumulam um único e grande grânulo, possuem tendência à forma ovóide; desta forma, proporcionam maior espaço para acúmulo de grandes quantidades de PHA. Jendrossek, Selchow e Hoppert^[12] observaram que células de *Beijerinckia indica* mais velhas, em repouso, tendem a se tornarem ovóide quando abrigam, principalmente, um único grânulo de PHA.

Os resultados de MET para células crescidas no meio F2 (fase 2), durante 48h, permitem inferir que, dentre as cepas analisadas e nas condições testadas, a cepa C31, para a qual foram obtidos os melhores resultados, é boa acumuladora de grânulos lipofílicos, sendo selecionada para a continuidade dos estudos.

Determinação da curva de crescimento celular da cepa C31

A determinação da curva de crescimento ou multiplicação celular da cepa C31 na fase 1, selecionada como mais promissora acumuladora de grânulos lipofílicos pela MET, foi realizada em meio F1. Este foi também o meio utilizado na fase 1 para as análises de MET. Na Figura 4 podem ser vistos os resultados.

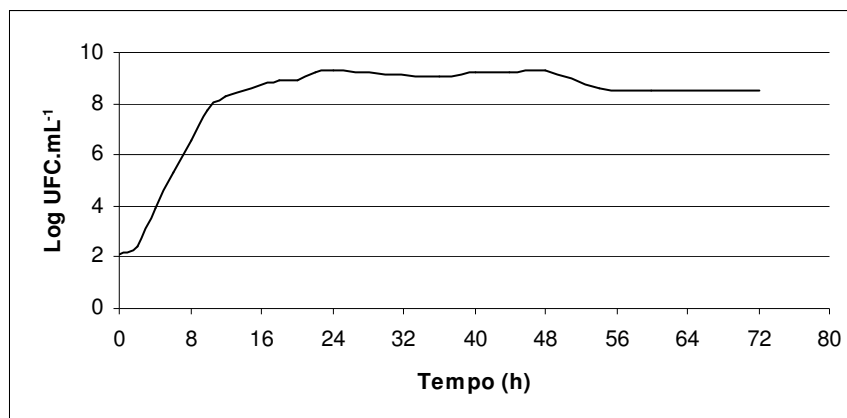


Figura 4. Curva de crescimento celular da cepa C31 no meio F1.

A curva obtida mostra que de zero a 2 h, as células passaram por uma curta fase de adaptação às condições do cultivo. Após este período, iniciou-se a fase de crescimento logarítmico, que ocorreu mais intensamente até a décima hora do cultivo; das 10 h até 24 h o crescimento foi menos intenso. A partir de 24 h houve um longo período, que se estendeu até 48 h, sem aumento da população bacteriana, caracterizando a fase estacionária, na qual a cepa atinge uma concentração celular constante em seu valor máximo. Isto demonstra que a fonte de carbono foi utilizada preferencialmente para manutenção da viabilidade celular e, possivelmente, para o acúmulo de metabólitos. Em 48 h de crescimento é encerrada a fase estacionária inicial, sendo verificada uma fase de declínio preliminar entre 48 h e 54 h, quando parece ter início uma segunda fase estacionária, que perdura até o último tempo monitorado, 72 h.

Segundo a literatura, a produção dos PHAs ocorre intracelularmente. Assim, em qualquer produção, procura-se partir para a fase de acúmulo com um cultivo com a mais elevada concentração possível de células relativamente jovens. Em geral, recomenda-se que as células estejam no final da fase de crescimento logarítmico^[4,40]. Assim sendo, o estudo da curva permitiu selecionar o tempo de 24 h de cultivo, nas condições testadas, para finalização da fase 1 (multiplicação celular) da produção.

Acompanhamento por MET do acúmulo de grânulos da cepa C31

Após ter sido confirmada a capacidade de produção e acúmulo de grânulos lipofílicos pela cepa C31 (Figura 3) e determinada sua curva de crescimento (Figura 4), foi realizado um acompanhamento, por MET, do acúmulo de grânulos ocorrido desde o final da fase 1 (tempo zero da fase 2), até 72 h de incubação. O meio utilizado na fase 2, meio F3, foi escolhido por tratar-se de meio tradicional para cultivo de *Beijerinckia* sp.^[41]. Na Figura 5 podem ser observados os resultados obtidos.

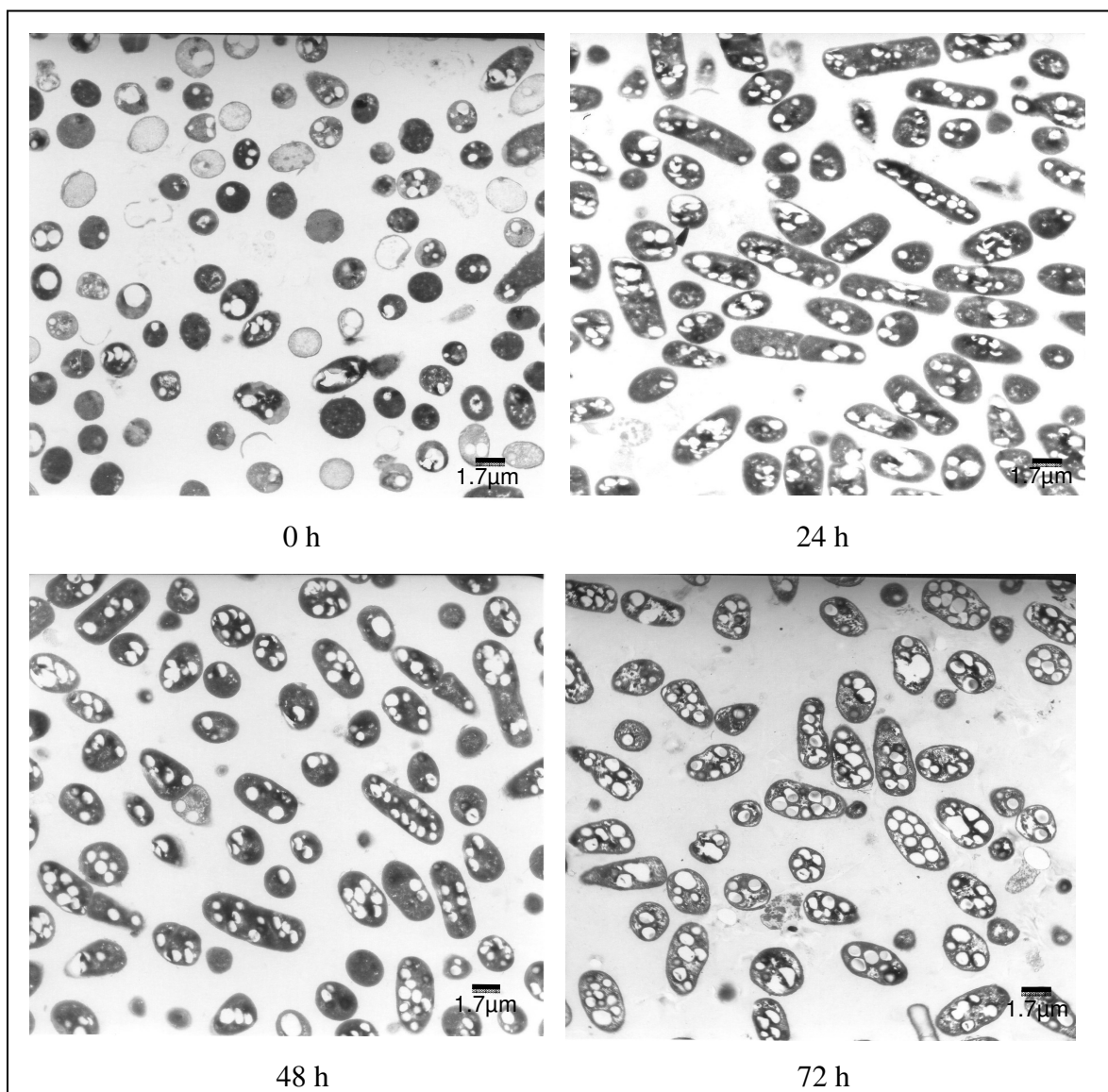


Figura 5- MET da cepa C31 para acompanhamento do acúmulo de grânulos lipofílicos em células cultivadas nos meios F1, durante 24 h (fase 1), e F3 (fase 2) em diferentes tempos.

Na Figura 5 pode ser observado um aumento progressivo na formação dos grânulos com o passar do tempo. É possível observar-se também que já no final da fase de multiplicação celular (fase 1), que corresponde ao início da fase de acúmulo de polímero (fase 2, 0 h), ocorreu formação dos grânulos. Já é conhecido que algumas bactérias necessitam de uma fase de multiplicação celular sem limitação de nutrientes, com objetivo de formação de um cultivo com alta densidade celular, seguida de outra fase de acúmulo do polímero, com limitação de um nutriente essencial ao seu crescimento e com excesso da fonte de carbono; este acúmulo ocorre geralmente no final da fase de crescimento (log) ou no início da fase estacionária de crescimento bacteriano. Entretanto, um segundo tipo de bactéria não necessita de limitação de nutriente essencial para o acúmulo de PHA, e a produção de polímero ocorre já na fase de crescimento exponencial^[42,40,4]. Conforme observações acima, podemos sugerir que este microrganismo não é estritamente dependente da limitação de um nutriente essencial para iniciar o acúmulo de grânulos.

Em 0 h, as células possuíam, em sua maioria, formato ovóide e acumularam um menor número de grânulos. Com o passar do tempo, ocorreu um aumento no número de grânulos por célula, bem como uma tendência de modificação do formato celular de ovóide para cilíndrico. A alteração do formato ovóide para cilíndrico contraria o sugerido por Jendrossek, Selchow e Hoppert^[12]; segundo observaram estes autores, as células jovens de *B. indica* é que teriam formato cilíndrico ou de bastonete, enquanto que as células maduras passariam ao formato oval. Tian, Sinskey e Stubbe^[28] também relataram a tendência de células bastonetes tornarem-se ovóides principalmente quando da presença de um único grande grânulo. Podemos inferir que, para a cepa C31, o formato celular parece estar mais relacionado ao tamanho e número de grânulos presentes nas células do que à fase de desenvolvimento ou idade.

Como se verificou o acúmulo de grânulos já no final da fase 1, optou-se por testar também tempos de incubação menores para a fase 1, a saber: 15 h, 20 h e, novamente, 24 h. Como em geral o tamanho dos grânulos foi menor do que o verificado nas células cultivadas no meio F2 (Figura 3), optou-se também pela reutilização do meio F2 e teste de um novo meio, F4. Os resultados para MET da cepa C31, cultivada nos meios F2 e F4, em 48 h, são mostrados na Figura 6.

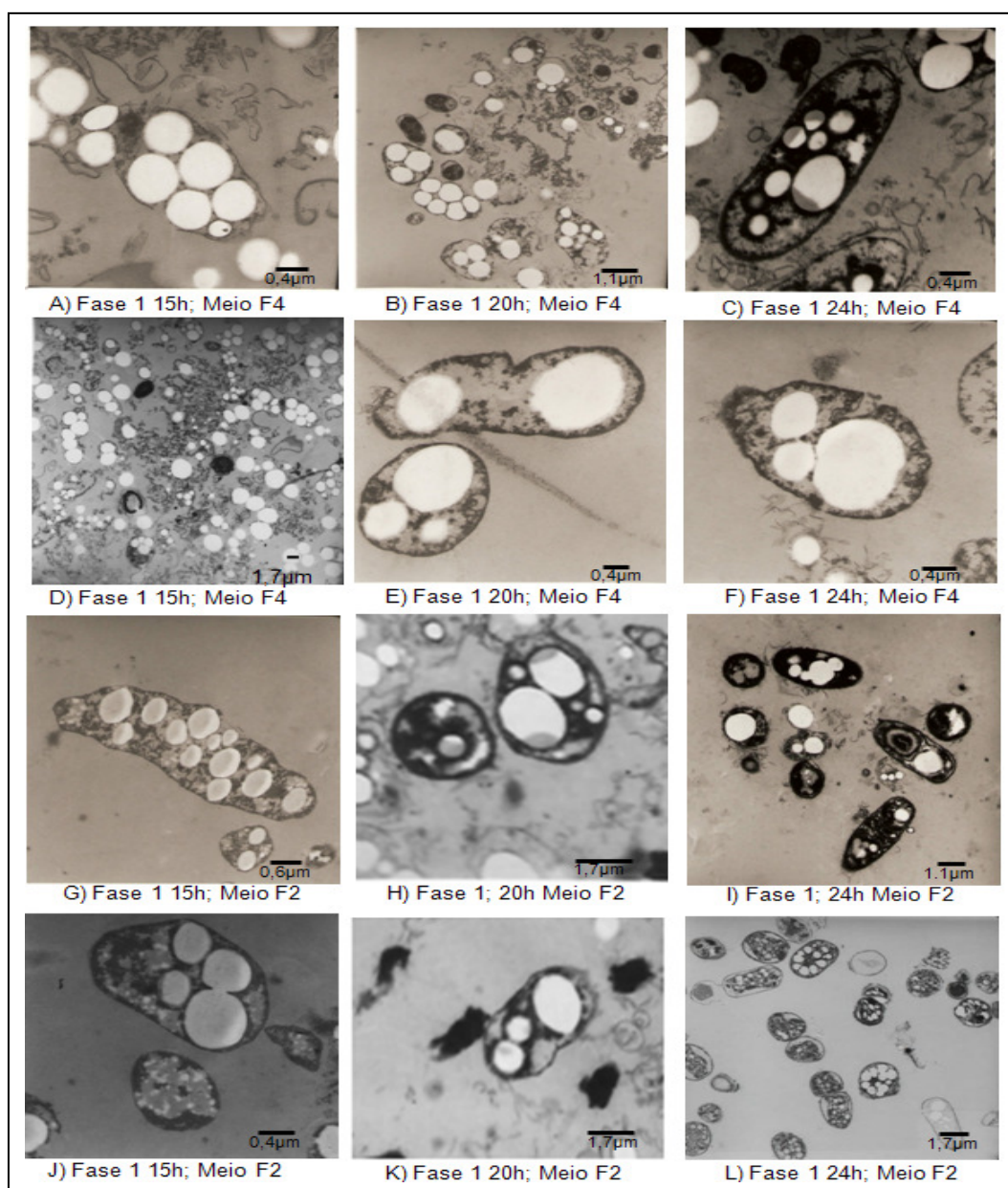


Figura 6 - MET da cepa C31 para acompanhamento do acúmulo de grânulos lipofílicos em células cultivadas nos meios F1 durante diferentes tempos (fase 1) e por 48 h nos meios F2 e F4, respectivamente.

A Figura 6 mostra não haver diferenças quanto ao número e tamanho dos grânulos provocadas pelos tempos de incubação de 15, 20 ou 24 h na fase 1, para os dois meios testados, F2 e F4. Levando-se em conta a curva de crescimento desta cepa (Figura 4), podemos sugerir que não houve diferenças na formação dos grânulos de PHA provocadas pela utilização de cultivos da fase 1 de produção com células ainda na fase de crescimento exponencial ou no início da fase estacionária de crescimento celular.

Já o meio utilizado na fase 2 influenciou o acúmulo de grânulos. O meio F4 propiciou a formação de grânulos maiores, com até $3\mu\text{m}$ (fotomicrografia D). Considerando o número de grânulos por célula, observa-se que o número varia de 1 (fotomicrografia B) a 7 grânulos (fotomicrografia C), enquanto que no meio F2 a variação foi de 1 (fotomicrografia I) a 13 grânulos (fotomicrografia G). Os resultados de acúmulo de grânulos verificados no meio F4 são iguais a alguns dos melhores encontrados na literatura, estando de acordo com os verificados por XU et al.^[43], Tian, Sinskey e Stubbe^[28] e Berlanga et al.^[29].

As fotomicrografias A, B, C, D e F da Figura 6 mostram diversas células lisadas com seus grânulos livres no meio. A fotomicrografia E mostra o início do rompimento da membrana de uma célula. Xu et al.^[43] relataram imagens de MET de cultivos para obtenção de PHB com 70 e 82 h. Segundo eles, neste período toda fonte de carbono, a glicose, já teria sido consumida; no entanto, prosseguiram a fermentação afim de avaliar a autólise celular e liberação dos grânulos de P(3HB) no meio de cultivo. No presente trabalho, como será demonstrado no item subsequente, os cultivos celulares da cepa C31, mesmo em 72 h de incubação nos meios F2, F3 ou F4, ainda apresentavam conteúdo mínimo de 15 g.L^{-1} de glicose. Entretanto, nos cultivos com o meio F4, onde verificou-se sensivelmente o fenômeno de lise celular, foi detectado o maior consumo de glicose (Figura 7 D).

Com o processo de acumulo do polímero as células tendem a mudar sua forma para acomodar melhor estes grânulos de reserva e aumentam de tamanho. Existem também

diferenças na parede celular de espécies diferentes de microrganismos; com as centrifugações as células podem ser rompidas.

Segundo Jendrossek^[44] os grânulos de PHA possuem estruturas biossintéticas, catabólicas, proteínas reguladoras e várias atividades enzimáticas. São envolvidos por uma membrana^[45,46,47]. Indicando que estas estruturas não são simples inclusões celulares de material de reserva de energia e sim organelas celulares e propôs uma denominação de “Carbonossomas”. Isto está em acordo com a definição de organelas celulares proposta por Pelczar et al.^[48], em que as organelas são estruturas envolvidas por membrana que realizam funções específicas, e também por Tortora, Funke e Case^[49], segundo os quais as organelas celulares são estruturas com formato específico e funções especializada, sendo características de células eucarióticas.

Produção celular e acúmulo de P(3HB) para determinações analíticas

Analisou-se, comparativamente, a evolução da massa celular seca, da concentração de substrato no caldo fermentado, o conteúdo de P(3HB) e a concentração deste polímero pela cepa C31 em três diferentes meios, F2, F3 e F4. Os resultados estão na Figura 7.

Em todos os meios testados foi utilizada a glicose, 40 g.L⁻¹ como fonte principal de carbono. O meio F2 foi utilizado anteriormente na obtenção de células para análise por MET, tendo sido confirmado por esta análise a capacidade da cepa C31 em acumular grânulos lipofílicos (Figura 3) quando cultivada nesse meio. O meio F3 é um meio tradicional, recomendado em cultivos de *Beijerinckia* sp^[41]. Possui como características principais a presença de nitrogênio orgânico oriundo da triptose e extrato de levedura, que são fonte de aminoácidos e vitaminas do complexo B, e os macroelementos fosfato, potássio e magnésio. No meio 4, à semelhança do meio 2, foi utilizada a uréia como fonte de nitrogênio orgânico;

possui como características distintivas a presença de citrato e oligoelementos e ausência dos macroelementos potássio e fosfato.

Através do acompanhamento da multiplicação celular, realizado por determinação gravimétrica da massa celular seca (MCS) (Figura 7 A), verificou-se um perfil de crescimento similar nos meios F2 e F4; já o meio F3 resultou num perfil um pouco diferenciado. Em todos os meios observou-se um crescimento da massa celular mais acentuado nas primeiras 24 h; entre 24 e 48 h, ocorreu uma redução no nível de crescimento, em relação ao período anterior, de modo mais acentuado no meio F4; de 48 a 72 h, nos cultivos com os meios F2 e F4, a redução foi ainda maior que no período anterior, enquanto que o cultivo no meio F3 manteve o crescimento. Entretanto, não foi detectado o início da fase de declínio celular em nenhum cultivo até o tempo final analisado, 72 h. Todos os cultivos tiveram uma baixa densidade celular, traduzida em massa celular seca, que variou de 0,45 g.L a 2,75 g.L ao final do cultivo, sendo obtido o melhor resultado com o meio F4. A literatura reporta valores 3,19 g.L^[50]; 3,81 g.L^[51] e 12,80 g.L^[52].

O consumo de substrato num cultivo celular para manutenção das células e síntese de produto é normal e esperado^[48]. No presente estudo, o substrato e fonte de carbono principal em todos os meios foi o açúcar redutor glicose. Observou-se que o consumo, verificado através da concentração no meio, ocorreu diferentemente nos 3 meios (Figura 7 B). Nos cultivos com os meios 3 e 4 ocorreu a maior redução, para cerca de 26 g, nas primeiras 24 h. No meio F4, foi registrado a maior redução nas 48 h, de 26,3 para 15,9 g.L⁻¹, sendo que nas 24 h seguintes a concentração de glicose foi maior, passando de 15,9 g.L⁻¹, em 48 h, para valores de 22,9 g.L⁻¹, em 72 h, final do cultivo. Isto se deve ao fato desta bactéria produzir um Exopolissacarídeo, que também sofre hidrólise liberando açúcares redutores^[16,53] interferindo na medição. Todos os caldos fermentados tiveram concentração final similar, ao redor de 25 (g.L⁻¹).

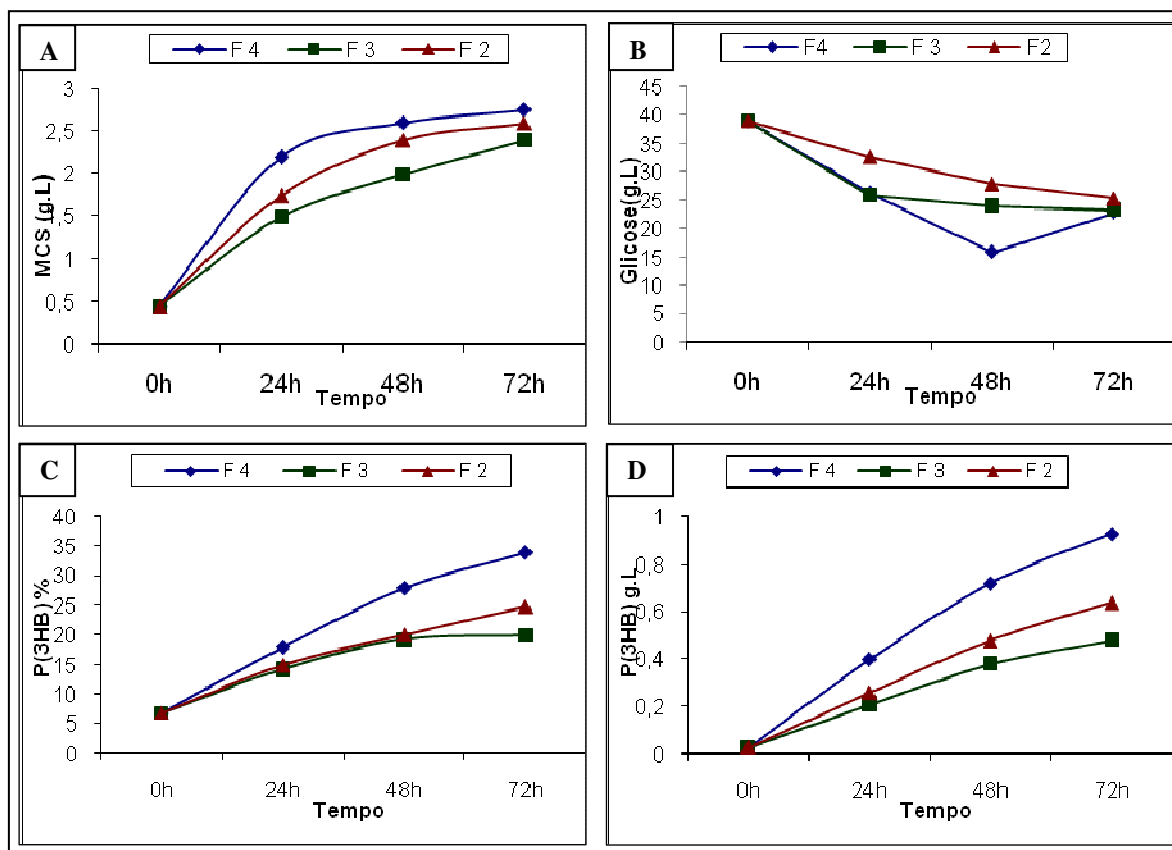


Figura 7 - Evolução da concentração da biomassa (A), evolução da concentração de açúcares no meio de cultivo(B), porcentagem de acúmulo de P(3HB) (C),evolução da concentração de P(3HB) g.L⁻¹ (D) para os meios F2, F3 e F4, utilizando a cepa de *Beijerinckia* sp. C31.

Os resultados de percentual P(3HB) em relação à massa celular úmida de concentração de P(3HB) em relação ao volume de caldo fermentado podem ser vistos na Figura 7 C e D, respectivamente. A maior concentração de P(3HB) ocorreu em 72 h de cultivo utilizando-se o meio F4, sendo 0,93 g.L⁻¹, com um conteúdo de 34%, seguido do meio F2 com 0,64 g.L⁻¹ e com um conteúdo de 24,8% e meio F3 com 0,48 g.L⁻¹ e com um conteúdo de P(3HB) de 20% (Figura 7 D e C). Embora a massa celular seca seja bem similar entre os meios F2, F3 e F4 em 72 h, a concentração de P(3HB) foi diferente. Isto reflete diferentes níveis ou percentuais de acumulação, conforme pode ser verificado na Figura 7 C. Os resultados mais elevados obtidos com a utilização do meio F4 podem ser devido à utilização do citrato neste meio^[54], visto ser este um importante intermediário do Ciclo do ácido cítrico na acumulação de P(3HB)^[55]. A elevada concentração de nitrogênio, presença de oligoelementos e ausência dos

macroelementos potássio e fósforo também parece ter influenciado. Aparentemente, o processo de síntese de P(3HB) ocorreu associado também à multiplicação celular, segundo o modelo proposto por Lee^[40].

A produção de PHB é parcialmente dependente da quantidade de células, pois a produção e acúmulo de polímero são intracelulares, mas como pôde ser observados, cultivos com resultados semelhantes de MCS (Figura 7 A) tiveram resultados diferenciados para percentual (Figura 7 C) e concentração de P(3HB) (Figura 7 D), em função do meio. No estudo de produção de P(3HB) pôde-se verificar que o meio de produção F4, rico em nitrogênio, citrato, oligoelementos e livre dos macroelementos potássio e fosfato, contribuiu para um maior acúmulo de P(3HB) em percentual e também para produzir grânulos maiores (Figura 6 D).

Identificação por Cromatografia Gasosa do polímero produzido

A Cromatografia Gasosa é comumente usada para detecção e dosagem de PHB ^[56], pois é um método que apresenta rapidez e reprodutibilidade nos resultados utilizando quantidades pequenas de amostras na ordem de 10^{-5} g.L⁻¹^[19].

Para verificar a identidade do material armazenado intracelularmente pela cepa C31, foram comparados os tempos de retenção dos picos obtidos nos cromatogramas das amostras dos polímeros produzidos pela cepa C31 nos meios F2, F3 e F4 em 72 h com o cromatograma do padrão (Figura 8). Analisando os cromatogramas, observamos que os picos encontrados nas amostras conferem com pico referente ao éster proveniente do P(3HB) de grau analítico derivatizado utilizado como padrão. Os picos com tempo de retenção em 8 e 9,4 min correspondem, respectivamente, ao éster derivado do P(3HB) e ao ácido benzóico, utilizado como padrão interno. O pico com tempo de retenção de 8,9 min pode ser referente a um produto de degradação do éster.

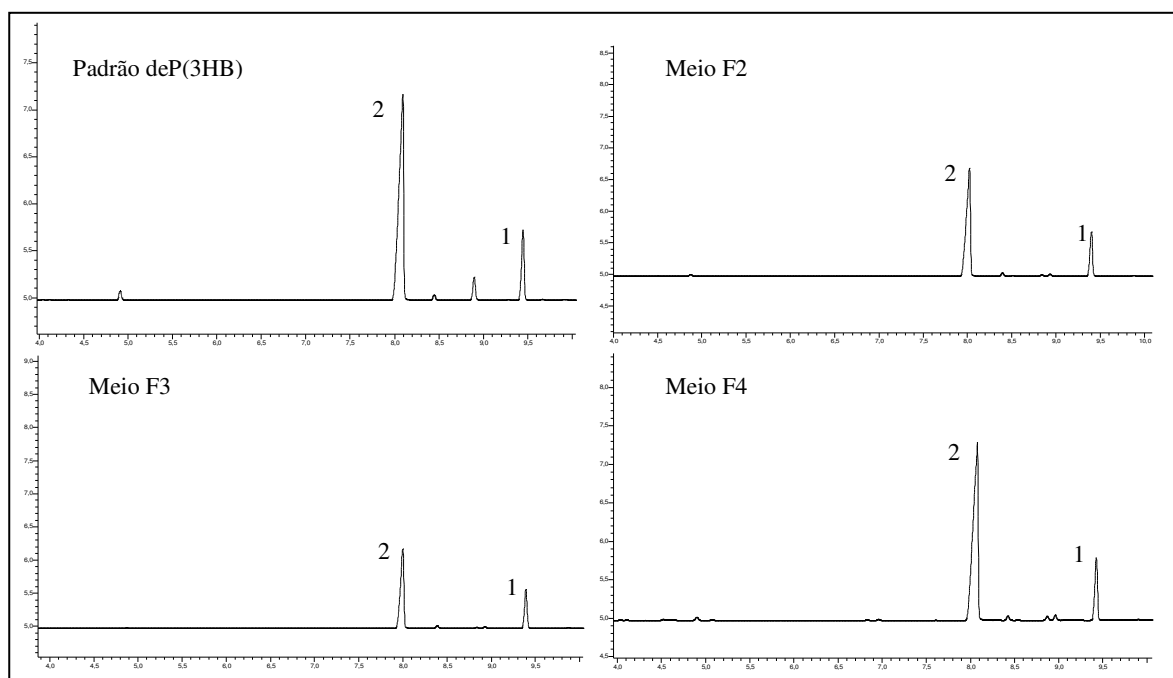


Figura 8- Cromatogramas do material lipofílico acumulado pela cepa C31 nos meios F2, F3 e F4 em 72 h e do padrão derivatizados. (1) padrão interno e (2) HB.

Formação do Filme de P(3HB)

Com material lipofílico extraído de células da cepa C31 cultivadas durante 72 h no meio F2 foi preparado um filme polimérico. O resultado pode ser observado na Figura 9.



Figura 9- Fotografia do filme de P(3HB) extraído de células da cepa C31 e obtido por evaporação lenta.

Fonte: o autor

O modo e tempo de evaporação do solvente influenciaram na textura do filme polimérico; foi observado que quando a evaporação do solvente era rápida, em placa de petri aberta, o filme polimérico ficava com uma textura rugosa; optou-se então pela evaporação lenta do

solvente dentro de uma placa de petri fechada, segundo metodologia de (DALCANTON, 2006)^[52].

O filme formado foi utilizado na análise de Infravermelho.

Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A identidade química do filme formado a partir do polímero extraído foi confirmada por Espectrometria no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR). As principais bandas obtidas foram analisadas e o espectro FT-IR é mostrado na Figura 10.

O espectro apresenta as bandas características do P(3HB): intensa banda a 1721 cm^{-1} devido a deformação axial da Ligação C=O no grupo éster; deformação axial assimétrica e simétrica da ligação C-H no grupo metil em 2975 e 2874 cm^{-1} ; deformação assimétrica da ligação C-H no grupo metileno em 2933 cm^{-1} ; deformação angular assimétrica e simétrica da Ligação C-H no grupo metil em 1453 e 1379 cm^{-1} ; deformação axial da ligação C-O no grupo éster em 1221 cm^{-1} . As bandas características identificadas no biopolímero obtido neste estudo estão de acordo com os reportados na literatura por, Thakor, Trivedi e Patel ^[57] e Xu et al.^[58] para P(3HB).

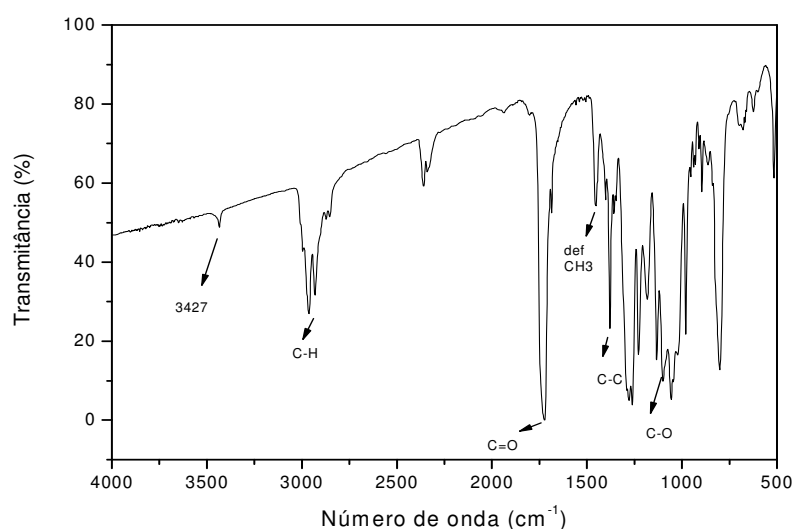


Figura 10- Espectro FT-IR para o polímero produzido pela cepa C31 no meio F2.

Conclusão

A bioprospecção realizada com 7 cepas de *Beijerinckia* sp. permitiu selecionar a cepa C31, produtora de P(3HB).

A microscopia óptica é uma ferramenta inicial eficaz na seleção de microrganismos acumuladores de grânulos lipofílicos.

Observa-se ótima correlação entre os dados obtidos pela microscopia eletrônica e os resultados de conteúdo e concentração de P(3HB).

A cepa C31 acumula grânulos em quantidade e tamanhos variados.

As células com acúmulo de vários grânulos mostram a tendência de mudar a morfologia ovóide para a de bacilo, já células com um único e grande grânulo tendem a se tornarem ovóides.

A cepa C31 é hábil em acumular P(3HB) a partir da utilização de glicose como substrato. No meio F4 acumulou uma concentração de P(3HB) de $0,93 \text{ g.L}^{-1}$, correspondendo a 34 % do material celular seco;

A espectrometria na Região do Infravermelho com transformada em Fourier (FT-IR) mostrou bandas características do P(3HB), confirmando que o biopolímero sintetizado pela cepa C31 e quantificado por Cromatografia Gasosa é realmente P(3HB).

A cepa C31 apresenta um elevado potencial para produção de P(3HB) em escala industrial.

Referências Bibliográficas

1. Piemolini, L. T. - “*Modelagem estrutural da PHA sintase de Chromobacterium violaceum para estudos de mutação sítio-dirigida*”, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal

- de Santa Catarina, Brasil (2004).
2. Lee, S. Y.; Choi, J. & Wong, H. H. - International Journal of Biological Macromolecules, **25**, p.31 (1999).
 3. Jendrossek, D. - Biomacromolecules, **6**, p.598 (2005).
 4. Khanna, S. & Srivastava, A. K. - Process Biochemistry, **40**, p.607 (2005).
 5. Shrivastav, A.; Mishra, S. K. & Mishra, S. - International Journal of Biological Macromolecules, **46**, p.255 (2010).
 6. Anderson, A. J. & Dawes, E. - Microbiology Review, **54**, p.450 (1990).
 7. Tchan, Y. T. Presence of *Beijerinckia* in northern Australia and geographic distribution. Proceedings of the Linnaean Society of New South Wales, v. **78**, p. 171-178, 1953.
 8. Becking, J. H. In The prokaryotes, 2nd ed. Eds. Springer Verlag: New York, p. 2254-2267, 1992.
 9. Becking, J. H. Studies on nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia*. Geographical and ecological distribution in soil. Plant and Soil, v.**14**, p. 49-81. 1961.
 10. Haywood, G. W.; Anderson, A. J; Dawes, E. A. The importance of PHB sintase substrate specificity in poly-hydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. FEMS Microbiol. Letters, v. **57**, p. 1-6, 1989.
 11. Stockdale, H.; Ribbons, D. W. & Dawes, E. A. - Journal of Bacteriology, **95**, p.1798 (1968).
 12. Jendrossek, D.; Selchow, O. & Hoppert, M. - Applied and Environmental Microbiology, **73**, p.586 (2007).
 13. Jeanes, A. - Food Technology, **5**, p.34 (1974).
 14. Wilson, E. E.; Zeiton, F. N. & Fredrickson, D.L. - Phythopatology, **57**, p.618 (1967).
 15. Oliveira, C. F. - “*Produção de polihidroxibutirato: bioprospecção de Beijerinckia sp, da coleção de bactérias do Laboratório de Biopolímeros, do Centro de Desenvolvimento*”

- Tecnológico (CDTec) – UFPel*”, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pelotas, Brasil (2010).
16. Vendruscolo, C. T. - “*Produção e caracterização do biopolímero produzido por Beijerinckia sp. isolada do solo da região de Ribeirão Preto-SP Brasil*”. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (1995).
 17. Lelliot, R. A. & Stead, D. E. – “Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants”, Methods in plant pathology, 2, British Society for Plant Pathology (1987).
 18. Miller, G. L. - Analytical Chemistry, **31**, p.426 (1959).
 19. Braunegg, G.; Sonnleitner, B. & Lafferty, R. M. – European Journal of applied Microbiology and Biotechnology., **6**, p. 29 (1978).
 20. Brandl, H.; Gross, R. A.; Lenz, R. W. & Fuller, R. C. - Applied Environmental Microbiology., **54**, p.1977 (1988).
 21. Schneider, A. L. S. - “*Síntese, caracterização e biodegradação de poli-3-hidroxibutirato obtido por Ralstonia eutropha*”, Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil (2006).
 22. Schaad, N. W. - “Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria”, St. Paul, Minnesota, EUA (2001).
 23. Bergey, D. H. - “Bergey’s Manual of Systematic bacteriology”, Baltimore, MD, EUA (1984).
 24. Pijuan, M.; Casas, C. & Baeza, J. A. - Process Biochemistry, **44**, p.97 (2009).
 25. Cortés, A. L.; Landázuri, A. L. & Maldonado, J. Q. G. - Microbial Ecology, **56**, p.112-120 (2008).
 26. Jendrossek, D. - Biomacromolecules, **6**, p.598 (2005).
 27. Peters, V. & Rehm, B. H. A. - FEMS Microbiology Letters, **248**, p.93 (2005).

28. Tian, J.; Sinskey, A. J. & Stubbe, J. - Journal of Bacteriology, **187**, p.3814 (2005).
29. Berlanga, M.; Montero, M. T.; Borrel, J. F. & Guerrero, R. - International Microbiology, **9**, p.95 (2006).
30. Loo, C. Y. & Sudesh, K. - International Journal of Biological Macromolecules, **40**, p.466 (2007).
31. Lugg, H.; Sammons, R. L.; Marquis, P. M.; Hewit, C. J.; Yong, P.; Beedle, M. P.; Redwood, M. D.; Stamboulis, A.; Kashani, M.; Jenkins, M.; Macaskie, L. E. - Biotechnol Letter, **30**, p.481 (2008).
32. Holmes, P. A. – Physics & Technology ., **16**, p.32 (1987).
33. Klinke, S.; Ren, Q.; Witholt, B.; Kessler, B. - Applied and Environmental Microbiology, **65**, p.540 (1999).
34. Crochemore, A. G. – “*Bioprospecção de espécies de Pseudomonas isoladas de solo de várzea subtropical do Rio Grande do Sul para produção de Polihidroxibutirato*”, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pelotas, Brasil (2010).
35. Luengo, J. M.; García, B.; Sandoval, A.; Naharro, G. & Oliveira, E. R. - Current Opinion in Microbiology, **6**, p.251 (2003).
36. Rehm, B. H. A. - Molecular Biology, **9**, p.41 (2009).
37. Steinbüchel, A.; LEE, S. Y., Jendrossek, D., Schirmer, A. & Choi, C.Y. - Applied. Microbiology and Biotechnology , **42**, p.901 (1995).
38. Wieczorek, R.; Pries, A.; Steinbüchel, A.; Mayer, F. Analysis of a 24-Kilodalton Protein Associated with the Polyhydroxyalkanoic Acid Granules in *Alcaligenes eutrophus*. Journal of Bacteriology, v. **177**, p. 2425-2435, 1995.
39. Potter, M.; Madkour, M. H.; Mayer, F. & Steinbüchel, A. - Microbiology, **148**, p.2413 (2002).
40. Lee, S. Y. - Tibtech, **14**, p.431 (1996).

41. Scamparini, A., Vendruscolo, C., Maldonade, I., Druzian, J. & Mariuzzo, D. – Hydrocolloids. Osaka: Elsevier, p.169 (2000).
42. Madison, L. L. & Huisman, G. W. - Microbiology and molecular biology reviews, **63**, p.21 (1999).
43. Xu, Y; Wang, R. H.; Koutinas, A. A. & Webb, C. - Process Biochemistry, **45**, p.153 (2010).
44. Jendrossek, D. - Journal of Bacteriology, 191, p. 3195-3202 (2009).
45. Sudesh, K.; Gan, Z.; Maehara,A.; Doi,Y. Polymer Degradation and Stability, 77, p.77 (2002).
46. Dennis, D.; Liebig, C.; Holley, T.; Thomas, H. S.; Khosla, A.; Wilson, D. & Augustine, B. - FEMS Microbiology Letters, **226**, p.113 (2003).
47. Sudesh, K.; Maehara, A.; Gan, Z.; Iwata,T. & Doi,Y. - Polymer Degradation and Stability, **83**, p.281 (2004).
48. Pelczar, M. J.; Chan, E. C. S. & Krieg, N. R. - “Microbiologia: Conceitos e Aplicações”, McGraw-Hill, São Paulo (1998).
49. Tortora, G.; Funke, B. R. & Case, L. L. - “Microbiologia”, Artes Médicas, Porto Alegre (2006).
50. Van-Thuoc, D.; Quilaguaman, J.; Mano, G. & Mattiasson, B. - Journal of Applied Microbiology, **104**, p.420 (2008).
51. Hosseini, Z. B. M.; Farahani, E. V.; Vazifekhoran, A. H.; Shojaosadati, S. A.; Karimzadeh, R. & Darani, K. K. - Bioresource Technology, **100**, p.2436 (2009).
52. Dalcanton, F. - “*Produção, extração e caracterização de poli(3- hidroxibutirato) por Ralstonia eutropha em diferentes substratos*”, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil (2006).
53. Borges, C. D.; Moreira, A. N.; Moreira, A. S.; DePino, F. A. B. & Vendruscolo, C. T. –

Ciênc. Tecnologia Alimententos, **24**, p.327 (2004).

54. Lugg, H.; Sammons, R. L.; Marquis, P. M.; Hewitt, C. J.; Yong, P.; Beedle, M. P.;

Redwood, M. D.; Stamboulis, A.; Kashani, M.; Jenkins, M. & Macaskie, L. E. -

Biotechnol Letter, **30**, p.481 (2008).

55. Zhang, Y.; Xin, J.; Chen, L.; Song, H. & Xia, C. - Journal of Natural Gas Chemistry, **17**,
p.103 (2008).

56. Braunegg, G.; Lefebvre, G. & Genser, K. F. - Journal of Biotechnology, **65**, p.127 (1998).

57. Thakor, N.; Trivedi, U. & Patel, K. C. - Bioresource Technology, **96**, p.1843 (2005).

58. Xu, J.; Guo, B. H.; Yang, R.; Wu, Q.; Chen, G. Q. & Zhang, Z.M. - Polymer, **43**, p.6893
(2002).

4 CONCLUSÕES

A bioprospecção de microrganismos produtores de P(3HB) entre cepas de *Beijerinckia* sp. mostrou-se eficiente, sendo que a presença de grânulos, o número e tamanho destes permitem concluir que a cepa C31 apresenta um elevado potencial para produção de P(3HB) em escala industrial. Trabalhos futuros complementarão a otimização das estratégias de cultivo para produção do biopolímero

As análises de CG e FT-IR comprovaram que os grânulos observados em MET sintetizados no meio testado constituem-se de P(3HB).

5 PERSPECTIVAS DE ESTUDOS

- Realização de experimentos em uma escala superior para produção de PHAs, em bioreator de bancada para produção de P(3HB) ;
- Realizar a modificação geneticamente dos isolados selecionados com inserção de genes para síntese de PHA, a fim de ampliar a produção do polímero;
- Caracterizar o polímero e analisar sua distribuição de massa molar;
- Realizar experimentos visando à obtenção de copolímeros para melhorar as propriedades do P(3HB).

6 REFERÊNCIAS

ABIPLAST. O Perfil da Indústria Brasileira de Transformação de Material Plástico 2009. Disponível em: <http://www.abiplast.org.br/plastics_industry2009.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2010.>

ANDERSON, G.R. Identification of *Beijerinckia* from Pacific Northwest soils. **Journal of bacteriology**, p.2105-2106, 1966.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO PLÁSTICO ABIPLAST. Perfil da Indústria Brasileira de transformação de material plástico 2008. São Paulo:**ABIPLAST**, 2008.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology Review**. 54, p. 450-472, 1990.

ASRAR, J., HILL, J. C. Biosynthetic processes for linear polymers. **Journal of Applied Polymer Science**. v.83, Issue 3, P. 457- 483, 2000.

ARTUSO. A. Bioprospecting, Benefit Sharing, and Biotechnological Capacity Building. **World Development**, v. 30, n. 8, 2002.

AZEVEDO, C. M. A. **BIOPROSPECÇÃO: Coleta de Material Biológico com a finalidade de explorar os recursos genéticos**. Série Ciência e Pesquisa, Caderno nº 17, São Paulo, 2003.

BERGEY, D. H. **Bergey's Manual of Systematic bacteriology**. Baltimore, MD, U.S.A, 1984.

BECKING, J. H. In **The prokaryotes**, 2nd ed. Eds. Springer Verlag: New York, p. 2254-2267,1992.

BECKING, J. H. Studies on nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia*. **Geographical and ecological distribution in soil. Plant and Soil**, v.14, p. 49-81. 1961.

BERGER, E.; RAMSAY, B. A.; RAMSAY, J. A.; CHAVARIE, C.; BRAUNEGG, G. PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. **Bitechnology Techniques**. 3: 227-232, 1998.

BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied Environmental Microbiology**. v. 54, p. 1977-1982, 1988.

BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTY, R. M. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 6, p. 29-37, 1978.

BUCCI, D. Z. **Avaliação de embalagens de phb (poli (ácido 3-hidroxibutírico) para alimentos**. 2003.166f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BUCCI, D. Z.; TAVARES, L. B. B.; SELL, I. Biodegradation and physical evaluation of PHB packaging. **Polymer testing**, v.26, p.908-915, 2007.

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and Discovery Strategies for Biotechnology: the Paradigm Shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 46, p. 573-606, 2000.

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

CANEVAROLO, S. V. **Ciência dos Polímeros**: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. São Paulo: ArtLiber Editora. 2007. 183 p.

CARMIGNAN, F.; BIDONE, J.; SENNA, L. E. Emprego dos Polihidroxialcanoatos em Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos. **American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 131-43, 2008.

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

COLIN, C.S.; RAGUÉNÈS, G.; COSTA, B.; GUEZENNEC, J. Biosynthesis of medium chain length poly-3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas guezenei* from various carbon sources. **Reactive & Functional Polymers**, v. 68, p. 1534–1541, 2008.

COSTA NETO, C. **Análise Orgânica** – Métodos e procedimentos para a caracterização de organoquímicos, v. 2, Editora UFRJ, Rio de Janeiro, 2005.

CORTÉS, A. L.; LANDÁZURI, Q. J; MALDONADO, G. Screening and Isolation of PHB-Producing Bacteria in a Polluted Marine Microbial Mat. **Microbial Ecology**, v. 56, p.112-120, 2008.

CHEN, G. Q.; WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering material. **Biomaterials**, v. 26, p. 6565-6578, 2005.

CHOI, J.; LEE, S. Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 51, p.13-21, 1999.

CHOI, J.; LEE, S. Y.; HAN, K.; **Appl. Environ. Microbiol.** v. 64, p. 4897, 1998.

CROCHEMORE, A. G. **Bioprospecção de espécies de *Pseudomonas* isoladas de solo de várzea subtropical do Rio Grande do Sul para produção de Polihidroxibutirato**. 2010. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciência) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

DAS, Q.; CHOWDHURY, J. U.; ANWAR, M. N. Isolation, Purification and Characterization of Biodegradable Polymer Producing Bacteria *Pseudomonas pseudomallei*. **International Journal Of Agriculture & Biology**, v. 07, p. 114-117, 2005.

DERX, H. G. Beijerinckia, a new genus of nitrogen-fixing bacteria occurring in tropical soil. **Proceedings Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen** , v. 53, p. 140-147, 1950.

DIAS, S. Plásticos biodegradáveis: soluções integradas para a área ambiental. **Revista Conecta**, p. 72-73, 2008.

DOBEREINER, J.; RUSCHEL, A. P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, v.1, p. 260-271, 1958.

DOBEREINER, J. Sobre a ocorrência de *Beijerinckia* em alguns Estados do Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 2, n.19, p. 151-160, 1959.

DOBEREINER, J. BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN THE TROPICS: SOCIAL AND ECONOMIC CONTRIBUTIONS. **Soil Biology Biochemistry**, v. 29, p. 771-774, 1997.

IORESE, M. L. **Estratégias de cultivo e recuperação e caracterização de poli(3-hidroxibutirato) produzido por *Ralstonia eutropha*. 2008.** 199f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

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

FORMOLO, M. C., SCHNEIDER A. L., DUARTE, M. A. T. PEZZIN A. P. T. Políhidroxialcanoatos: biopolímeros produzidos a partir de fontes renováveis, **Revista Saúde e Meio Ambiente**. n. 2, v. 4, p. 14-21, 2003b.

GRAGE, K.; JAHNS, A. C.; PARLANE, N.; PALANISAMY, R.; RASIAH, A. I.; ATWOOD, J. A.; REHM, B. H. A. Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 660-669, 2009.

GRIEBEL, R.; SMITH, Z.; MERRICK, J. M. Metabolism of Poly- β -hydroxybutyrate. I. Purification, Composition, and Properties of Native Poly- β -hydroxybutyrate Granules from *Bacillus megaterium*. **Biochemistry**, 1968.

GARCIA, M. C. F. **Proposta de um processo de extração de poli(3-hidroxibutirato) produzido por *Cupriavidus necator* e seu efeito sobre as características do polímero**. 2006. 158f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

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

GU, J. D. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 52, p. 69–91, 2003.

Hankermeyer, C. R.; Tjeerdema, R. S. Polyhydroxybutyrate plastic made and degraded by microorganisms. **Reviews of Environmental Contamination & Toxicology**, v. 159, p. 1-24, 1999.

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

HAYWOOD, G. W.; ANDERSON, A. J; DAWES, E. A. The importance of PHB sintase substrate specificity in poly-hydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 57, p. 1-6, 1989.

HOLMES, P. A.; Biologically produced (R)- 3 – Hydroxyalkanoate Polymers and Copolymers”. In: Development in crystalline polymers - 2, **Elsevier**, London 1988.

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

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

JAMES, B. W.; MAUCHLINE, W. S.; DENNIS, P. J.; KEEVIL, C. W.; WAIT, R. Poly-3-Hydroxybutyrate in *Legionella pneumophila*, an Energy Source for Survival in Low-Nutrient Environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 822-827, 1999.

JENDROSSEK, D.; SELCHOW, O.; HOPPERT, M. Poly(3-Hydroxybutyrate) Granules at the Early Stages of Formation Are Localized Close to the Cytoplasmic Membrane in *Caryophanon latum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 586-593, 2007.

JENDROSSEK, D. Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 1186-1196, 2007.

JENDROSSEK, D.; HANDRICK, R. Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 56, p. 403-32, 2002.

JENDROSSEK, D. Fluorescence Microscopical Investigation of Poly(3-hydroxybutyrate) Granule Formation in Bacteria, **Biomacromolecules**, v. 6, p. 598-603, 2005.

JENDROSSEK, D. Polyhydroxyalkanoate Granules Are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes). **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 3195-3202, 2009.

JOSÉ, B. M. L.; JUNIOR, C. A.; GONÇALVES, J. L. M. Avaliação do crescimento em viveiro e campo de mudas de *Eucalyptus grandis* produzidos em tubetes de polihidroxibutirato (PHB). In: **58ª Reunião Annual da SBPC**, 2006 Florianópolis. Anais da 58ª Reunião Annual da SBPC, 2006.

KESSLER, B.; PALLERONI, N. J. Taxonomic implications of synthesis of poly-*b*-hydroxybutyrate and other poly-*b*hydroxyalkanoates by aerobic pseudomonads. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 711–713, 2001.

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

KHANAFARI, A.; SEPAHEI, A. A.; MOGHARAB, M. Production and Recovery of Poly- β -hydroxybutyrate from whey degradation by *Azotobacter*. **Iran. J. Environ. Health**, v. 3, p. 193-198, 2006.

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

KIRWAN, M. J.; STRAWBRIDGE, J. W. Plastics in food packaging. **Food Packaging Technology**, p. 174-240, 2003.

KOYAMA, N.; DOI, Y. Continuous production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 281-284, 1995.

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

KUSAKA, S.; ABE, H.; LEE, S. Y.; DOI, Y. Molecular mass of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] produced in a recombinant *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, p. 140-143, 1997.

LAGEVEEN, R. G.; HUISMAN, G. W.; PREUSTING, H.; KETELAAR, P.; EGGINK, G.; WITHOLT, B. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly(R)-3-hydroxyalkanoates and poly(R)-3-hydroxyalkenoates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 2924-2932, 1988.

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

LEE, S. Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Tibtech**, v. 14, p. 431-438, 1996.

LEE, S. Y. *E. coli* moves into the plastic age. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 17-18, 1997.

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

LEE, S. Y.; WONG, H. H.; CHOI, J. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by high-cell-density cultivation of *Pseudomonas putida* under phosphorus limitation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, p. 466-470, 2000.

LELLIOT, R. A.; STEAD, D. E. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Palo Alto, Blackwell, 1ed., v. 216, p. 171-172, 1987.

LI, R.; Zhang, H.; Qi, Q. The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2313-2320, 2007.

LING, Y.; WONG, H. H.; THOMAS, C. J.; WILLIAMS, D. R. G.; MIDDELBERG, A. P. J. Pilot-scale extraction of PHB from recombinant *E. coli* by homogenization and centrifugation. **Bioseparation**, v. 7, p. 9-15, 1997.

LIMA, R. A. **ANÁLISE BIBLIOMÉTRICA DA ATIVIDADE CIENTÍFICA EM BIOPROSPECÇÃO (1986 - 2006)**. 2007. 108f. Dissertação (Mestrado em Política Científica e Tecnológica) – Programa de Pós-Graduação em Política Científica e Tecnológica. Universidade estadual de Campinas. Campinas - SP.

LOO, C. Y.; SUDESH, K. Biosynthesis and native granule characteristics of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in *Delftia acidovorans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, p. 466-471, 2007.

LUCAS, N.; BIENAIME, C.; BELLOY, C.; QUENEUDEC, M.; SILVESTRE, F.; SAUCEDO, J. E. N. **Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques**. Chemosphere, v. 73, p. 429–442, 2008.

LUZIER, W. D. Materials derived from biomass biodegradable materials. **Proceedings of the National Academy of Sciences.**, v. 89, p. 839-842, 1992.

LUENGO, J. M.; GARCÍA, B.; SANDOVAL, A.; NAHARROY, G.; OLIVEIRA, E. R. Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, n. 6, p. 251–260 (2003).

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 63, n. 1, p. 21-53, 1999.

MGC, 2010. Biogreen (biodegradable plastic). Disponível em: <<http://www.mgc.co.jp/eng/products/abc/06.html>>. Acesso em 14 Mai. 2010.

MARTINS, P. F. Q.; MACHADO, A. R. T.; OLIVEIRA, A. A.; FONSECA, E. M. B.; LOPES, J. H.; GUARIEIRO, A. L. N.; REIS, K. C. Estudo da dispersão de atrazina em matriz polimérica de polihidroxibutirato. In: **31ª Reunião Anual da Sociedade**

Brasileira de Quimica, 2008, Águas de Lindóia. Resumos da 31^a. Reunião Anual da SBQ. Sociedade Brasileira de Quimica, 2008. v. 31., p. QA-211-QA-211.

NASCIMENTO, J. F. **Estudo da processabilidade e da caracterização do poli(ácido-3-hidroxibutírico) - PHB obtido a partir de cana-de-açúcar**. 2001 Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP.

ORTEGA FILHO, S. O potencial da agroindustria canavieira no Brasil. Relatório PHB Industrial S/A e Faculdade de Ciências farmacêuticas (USP), 2003.

PACHIONE, R. **Revista Plástico Moderno**, p. 10-17, 2004.

PHB Industrial. Disponível em: <<http://www.inovacao.unicamp.br/pipe/report/061030-phb.shtml>>. Acesso em: 12 Mai. 2010.

PHB INDUSTRIAL S.A. Biocycle. Disponível em: <<http://www.biocycle.com.br>>. Acesso em: 05 de janeiro de 2009.

PIJUAN, M.; CASAS, C.; BAEZA, J. A. Polyhydroxyalkanoate synthesis using different carbon sources by two enhanced biological phosphorus removal microbial communities. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 97-105, 2009.

PREUSTING, H.; HAZENBERG, W.; WITHOLT, B. Continuous production of poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas oleovorans* in a high-cell-density, two-liquid-phase chemostat. **Enzyme and Microbial Technology**, v.15, p. 311-316, 1992.

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

QIANG, C. G.; JUN, X.; QIONG, W.; ZENGMING, Z.; KWOK-PING, H. Synthesis of copolyesters consisting of medium-chain-length β -hydroxyalkanoates by

Pseudomonas stutzeri 1317. **Reactive & Functional Polymers**, v. 48, p.107–112, 2001.

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

REHM, B. H. A. Biogenesis of Microbial Polyhydroxyalkanoate Granules: a Platform Technology for the Production of Tailor-made Bioparticles. **Cimb**, v. 9, p. 41-62, 2005.

REHM, B. H. A. Biogenesis of Microbial Polyhydroxyalkanoate Granules: a Platform Technology for the Production of tailor-made Bioparticles. **Molecular Biology**, v. 9, p. 41-62, 2009.

RAVEN, P.H. Biology of plants. New York: **Worth Publisher**, p.728, 1996.

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatographic determination of poly-b-hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. **Journal of Chromatography**, v. 445, p. 285-289, 1988.

ROSA, D. S.; LOTTO, N. T.; LOPES, D. R.; GUEDES, C. G. F. The use of roughness for evaluating the biodegradation of poly-3-(hydroxybutyrate) and poly-3-(hydroxybutyrate-co-valerate). **Polymer Testing**, v. 23, p. 3-8, 2004.

RYU, H. W.; HAHN, S. K.; CHAN, Y. K.; CHANG, H. N. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutropus* with phosphate limitation. **Biotechnology Bioengineering**, v. 55, p. 28-32, 1997.

SAVENKOVA, L.; GERBERGA, Z.; MUTTER, O.; NIKOLAEVA, V.; DZENE, A.; TUPUREINA, V. PHB-based films as matrices for pesticides. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 719-722, 2001.

SERAFIM, L. S.; LEMOS, P. C.; OLIVEIRA, R. F.; REIS, M. A. M. Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 87 (2), p. 145–160, 2004.

SERAFIM, L. S., LEMOS, P. C., Levantesi, C.; Tandoi, V.; Santos, H.; REIS, M. A. M. Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 51, p. 1 – 18, 2002.

SERAFIM, L. S.; LEMOS P. C.; REIS, M. A. M. Produção de Bioplásticos por Culturas Microbianas Mistas. **Biotecnologia Microbiana**, 2003.

SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; ROCHA, R. C. S.; TACIRO, M. K.; PRADELLA, J. G. C. Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1732-1743, 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSIER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Guanabara Dois (2007).

SIRACUSA, V.; ROCCULI, P.; ROMANI, S.; ROSA, M. D. Biodegradable polymers for food packaging: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. 634-643, 2008.

SHAH, A. A.; HASAN, F.; HAMEED, A.; AHMED, S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, 26, p. 246–265, 2008.

SHRISVASTAV, A.; MISHRA, S. K.; MISHRA, S. Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by *Spirulina subsalsa* from Gujarat coast of india. **International journal of Biological Macromolecules**, 2010.

SQUIO, C. R.; ARAGÃO, G. M. F. Estratégias de cultivo para a produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-hidroxibutirato) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por bactérias. **Química Nova**, v. 27, n. 4, 615-622, 2004.

STEINBÜCHEL, A., VALENTIN, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 128, p. 219-228, 1995.

STEINBÜCHEL, A.; LUTKE-EVERSLOH, T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biotechnological Engineering Journal**, v. 16, p. 81-96, 2003.

STEINBÜCHEL, A.; LEE, S. Y., JENDROSSEK, D., SCHIRMER, A.; CHOI, C. Y. Biosynthesis of copolyesters consisting of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acid from 1-3 butanediol or from 3-hydroxybutyrate by *Pseudomonas* sp A33. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 901-909, 1995.

STOCKDALE, H.; RIBBONS, D. W.; DAWES, E. A. Occurrence of Poly- β -Hydroxybutyrate in the Azotobacteriaceae. **Journal of Bacteriology**, v. 95, p. 1798-1803, 1968.

STUBBE, J.; TIAN, J.; HE, A.; SINSKEY, A. J.; LAWRENCE, A. G.; LIU, P. Nontemplate-dependent polymerization processes: polyhydroxyalkanoate synthases as a paradigm. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, p. 433-80, 2005.

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

SUDESH, K.; GAN, Z.; MAEHARA, A.; DOI, Y. Surface structure, morphology and stability of polyhydroxyalkanoate inclusions characterised by atomic force microscopy. **Polymer Degradation and Stability**, v. 77, p. 77-85, 2002.

SUDESH, K.; MAEHARA, A.; GAN, Z.; IWATA, T.; DOI, Y. Direct observation of polyhydroxyalkanoate granule-associated-proteins on native granules and on poly(3-hydroxybutyrate) single crystals by atomic force microscopy. **Polymer Degradation and Stability**, v. 83, p. 281-287, 2004.

TCHAN, Y. T. Presence of *Beijerinckia* in northern Australia and geographic distribution. **Proceedings of the Linnaean Society of New South Wales**, v. 78, p. 171-178, 1953.

TIM, A.; STEINBÜCHEL, A. Formation of polyester consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent *Pseudomonas*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 56, n. 11, p. 3360-3367, 1990.

TORRES, O. A. D. **A Bioprospecção na Colômbia: um Exemplo de Conflito Entre as Capacidades de Ciência e Tecnologia e o Marco Regulatório**. 2009. 133f. Tese (Doutorado em Política Científica e Tecnológica) – Programa de Pós-Graduação em Política Científica e Tecnológica. Universidade estadual de Campinas. Campinas - SP.

TRIGUEIRO, M. G. S. **Bioprospecção, uma nova fronteira da sociedade**. 2006. Relatório de Pesquisa (DPCT- IGE) – Universidade Estadual de Campinas.

Uchino, K.; Saito, T.; Gebauer, B.; Jendrossek, D. Isolated Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Granules Are Complex Bacterial Organelles Catalyzing Formation of PHB from Acetyl Coenzyme A (CoA) and Degradation of PHB to Acetyl-CoA. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 8250-8256, 2007.

VANZIN, C. **Estudo da biossíntese de Poli-3-Hidroxibutirato-co-Hidroxialcanoatos de Cadeia Média (P3HB-co-3HAMcl) a partir de ácidos graxos livres e óleo vegetal**. 2008.f 202. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan /IPT. São Paulo - SP.

VERLINDEN, R. A. J.; HILL, D. J.; KENWARD, M. A.; WILLIAMS, C. D.; Radecka, I. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1437-1449, 2007.

VIANA, V. M.; VERÍSSIMO, A.; PINHEIRO, L. A. F. V. Estratégia nacional de diversidade biológica utilização sustentável de componentes da diversidade biológica e incentivos. Campinas: Base de Dados Tropical, 1998. Disponível em: <<http://www.bdt.org.br/publicacoes/politica/gtt/gtt4>>. Acesso em: 08/09/09.

WIECZOREK, R.; PRIES, A.; STEINBÜCHEL, A.; MAYER, F. Analysis of a 24-Kilodalton Protein Associated with the Polyhydroxyalkanoic Acid Granules in *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 2425-2435, 1995.

ZHANG, L. L.; GOH, S. H.; LEE, S. Y.; HEE, G. R. **Polymer**, v. 41. p. 1429-1439, 2000.

ZINN , M.; WITHOLT, B.; EGLI, T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial Polyhydroxyalkanoate. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 53, p. 5-21, 2001.