

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE POLI-HIDROXIALCANOATOS PARA A GERAÇÃO DE POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS NO BRASIL**Luiziana Ferreira da Silva*** e **José Gregório Cabrera Gomez**

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, 05508-000 São Paulo – SP, Brasil

Rafael Costa Santos Rocha, Marilda Keico Taciro e José Geraldo da Cruz Pradella

Centro de Tecnologia de Processo e Produtos, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A., Av. Prof. Almeida Prado, 532, 05508-901 São Paulo – SP, Brasil

Recebido em 4/9/06; aceito em 17/11/06; publicado na web 29/8/07

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES IN BRAZIL FOR BIODEGRADABLE POLYMERS. In recent years, several studies have been developed in Brazil to produce biodegradable materials. A particular family of bacterial polymers, the polyhydroxyalkanoates (PHA), has received special attention. PHAs are thermoplastic, biodegradable, biocompatible, are synthesised from renewable resources and can substitute petrochemical plastics in some applications. Different aspects have been focused to increase productivity and to reduce the cost of PHA production: bacterial improvement, use of industrial by-products as raw material, bioreactor design, process operation strategies, downstream process, mathematical modelling, polymer characterisation, application and biodegradability of blends. A production process was transferred to industry and studies to produce new PHA by controlling monomer composition are in progress. All these aspects are presented in this review.

Keywords: polyhydroxyalkanoates; microbial polyester; biodegradable polymers.

INTRODUÇÃO

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

A experiência da utilização de etanol como combustível e o incentivo atual à produção de biodiesel são exemplos concretos do uso de matérias-primas renováveis em substituição a derivados de petróleo. Além do suprimento de necessidades energéticas, a segunda maior demanda pelo uso de derivados de petróleo como matéria-prima consiste na produção de polímeros. É desnecessário salientar os enormes problemas ambientais e de logística que as alternativas atuais de incineração, aterramento e reciclagem destes polímeros têm causado às sociedades desenvolvidas e em desenvolvimento.

Uma vasta gama de alternativas biodegradáveis têm sido propostas para mitigar o problema. As matérias-primas utilizadas podem ser totalmente renováveis, como é o caso dos poli-hidroxicanoatos bacterianos (PHA)^{1,2} e o polilactato proposto pelo consórcio Dow-Cargil³, ou não renováveis, como as alternativas da Showa Highpolymer do Japão⁴ e da BASF⁵. Os principais precursores para síntese desses últimos polímeros poderão, em um futuro próximo, também vir a ser produzidos via microbiológica, a partir de matérias-primas renováveis. Os poli-hidroxicanoatos bacterianos constituem uma classe de polímeros bastante estudada no país e possuem as características de biodegradabilidade e de renovabilidade.

Dois componentes são preponderantes na determinação do preço dos polímeros produzidos a partir de matéria-prima renovável e são

imperativos para garantir uma competição com polímeros de origem petroquímica: custo da matéria-prima e energia, bem como de investimento de capital para implantação de uma unidade industrial de produção⁶. Na questão do custo da matéria-prima e energia é amplamente reconhecida a vantagem competitiva do nosso país devido suas condições edafoclimáticas favoráveis e grande extensão territorial (potencial de produzir biomassa). Resta, portanto, converter estas vantagens competitivas em processos de alto desempenho e economicamente diferenciados. Dentro deste quadro, nos últimos anos houve um esforço, no Brasil, realizado por diversos grupos de pesquisa para viabilizar a produção de PHA, apresentados retrospectivamente nesta revisão, baseada em publicações completas envolvendo pesquisadores nacionais.

A partir de um projeto conjunto entre um instituto de pesquisa, a universidade e o setor privado, em 1991, houve um estímulo ao estudo da produção de diversos plásticos biodegradáveis no país⁷⁻¹¹, com enfoques diversificados. Um grande esforço foi realizado¹²⁻²¹ e resultou no desenvolvimento de processo de produção de PHB e PHB-co-HV, dois polímeros da família dos PHA, a partir de sacarose como fonte de carbono principal, que foi transferido para a empresa PHB Industrial S/A²², havendo no momento diversos trabalhos de caracterização e aplicação dos PHA.

POLI-HIDROXIALCANOATOS (PHA)

O termo PHA (Figuras 1 e 2) é aplicado a uma família de poliésteres acumulados por diversas bactérias, na forma de grânulos intracelulares de reserva de carbono, energia e equivalentes redutores^{23,24}. Em geral, a síntese de PHA por bactérias em um meio nutritivo ocorre quando há excesso de fonte de carbono e a limitação de pelo menos um nutriente necessário à multiplicação das células (N, P, Mg, Fe etc.)^{1,25,26}.

Estes polímeros despertam grande interesse, pois são

*e-mail: lukneif@usp.br



Figura 1. Células bacterianas contendo grânulos de polímero biodegradável, da família dos poli-hidroxialcanoatos (PHA) no seu interior (fotomicrografia eletrônica)

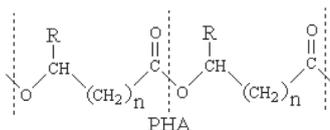


Figura 2. Fórmula química geral dos PHA. n pode variar de 1 a 3. Quando o grupo R for igual a H , CH_3 , CH_2CH_3 , para $n=1$, os PHA são classificados como PHAscl (“short chain length”), ou seja, compostos por monômeros de cadeia curta. Quando $R = (CH_2)_2CH_3$ a $(CH_2)_8CH_3$, os monômeros são considerados de cadeia média, constituindo os PHAmcl (“medium chain length”)

termoplásticos, biodegradáveis, biocompatíveis e podem ser sintetizados a partir de matérias-primas renováveis pela agricultura^{22, 27,28}. Suas propriedades permitem que sejam utilizados como substitutos dos plásticos convencionais, de origem petroquímica, em algumas aplicações². As propriedades do polímero, bem como suas aplicações, dependem de sua composição monomérica². Por outro lado, a produção de PHA depende da natureza química da matéria-prima oferecida como fonte de carbono à bactéria, bem como das vias metabólicas que esta possui. Em diversas etapas do metabolismo, a partir da fonte de carbono, a bactéria pode gerar intermediários na forma de hidroxiacil-CoA, os quais serão reconhecidos e polimerizados pela enzima PHA sintase, presente nas bactérias capazes de acumular estes materiais (Figura 3).

A PHA sintase é a enzima chave para a biossíntese de PHA, uma vez que sua especificidade pelo substrato definirá a natureza do polímero final. Quatro classes de PHA sintases já foram descritas²⁹,

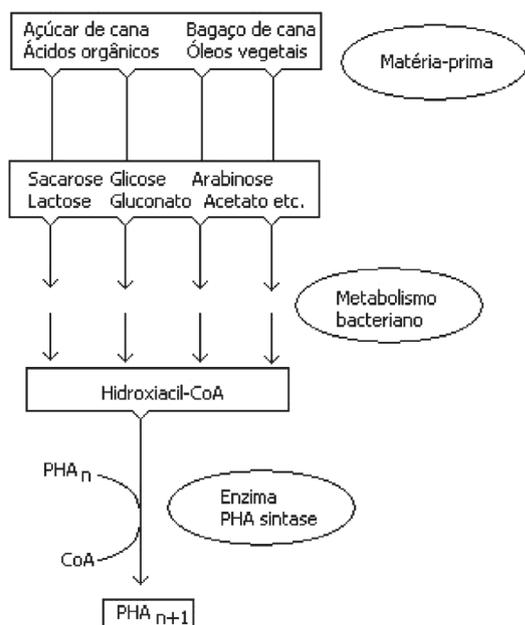


Figura 3. Fatores que influenciam na síntese de PHA por bactérias

das quais são destacadas aqui as PHA sintases da classe I, capazes de polimerizar unidades de hidroxiacil-CoA com cadeia curta (3-5 átomos de carbono) e as de classe II, específicas para monômeros de cadeia média (6-14 átomos de carbono). Definem-se assim dois grandes grupos de PHA gerados por estas enzimas: PHAscl (“short chain length”) e PHAmcl (“medium chain length”)³⁰. Enquanto o primeiro grupo apresenta propriedades termoplásticas, o segundo apresenta-se como elastômero, o que diferencia suas aplicações. Assim, há grande potencial para produzir PHA bacterianos com diferentes composições e propriedades diversas. Mais de 150 hidroxialcanoatos distintos já foram identificados como constituintes de PHA bacterianos^{25,31}. Por esta razão, o domínio sobre o processo de síntese pode permitir a produção de PHA sob medida para as aplicações que se desejar. O primeiro polímero da família dos PHA a ser estudado foi o homopolímero poli-hidroxibutirato (PHB), cujas propriedades termoplásticas foram logo em seguida modificadas pela produção do copolímero de poli-hidroxibutirato e hidroxivalerato (PHB-co-HV)³².

POLI-HIDROXIBUTIRATO (PHB)

PHB é um homopolímero composto por unidades monoméricas de quatro átomos de carbono. O impulso para este estudo ocorreu no início da década de 90, quando teve início o projeto “Produção de plásticos biodegradáveis a partir de cana-de-açúcar, por via biotecnológica” que foi desenvolvido em cooperação pelo Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), o Centro de Tecnologia da Copersucar e o Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (este, associado à Universidade Federal da Paraíba)^{18,22}, utilizando recursos do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Financiadora de Estudos e Projetos (PADCT- Finep)^{18,24,33}.

Tanto este trabalho pioneiro, como aqueles desenvolvidos a partir de então, por outros grupos de pesquisa, direcionaram seus esforços para os seguintes temas-chave para a produção de PHA a custos reduzidos: obtenção de microrganismos eficientes no acúmulo de PHA; produção destes materiais pelo uso de matérias-primas de baixo custo no país e renováveis pela agricultura; aumento de produtividade, pelo cultivo microbiano a alta densidade celular; busca de reatores alternativos e, adequação das características do produto pela modulação da massa molar. No que se refere à produção de PHB, as abordagens adotadas no país estão comentadas a seguir.

A busca por microrganismos eficientes na produção de PHB a partir de diferentes matérias-primas

A busca em coleções de microrganismos por linhagens capazes de produzir PHB a partir de sacarose em PHB trouxe resultados insatisfatórios, pois algumas, embora capazes de utilizar a sacarose, realizavam sua conversão a polímero de modo ineficiente, enquanto outras, embora capazes de acumular eficientemente alta quantidade de PHB a partir de glicose e frutose, eram incapazes de crescer em sacarose³⁴. Para contornar este problema, nos primeiros trabalhos desenvolvidos no Brasil duas linhas foram adotadas para se ter bactérias utilizadoras de sacarose: o isolamento e seleção de bactérias de diversos nichos ambientais e obtenção de linhagens recombinantes. Paralelamente, para agilizar o desenvolvimento do processo de produção, em biorreatores com tanques agitados mecanicamente, estudos utilizaram a linhagem padrão *Alcaligenes eutrophus* DSM 545 (posteriormente denominada *Ralstonia eutropha* e, atualmente, *Cupriavidus necator*). Posteriormente, diversos materiais, incluindo resíduos industriais foram testados para a produção de PH, utilizando tanto linhagens isoladas da natureza, como modificadas geneticamente.

Produção de PHB por *Ralstonia eutropha*

O processo proposto de produção de polímero previa a condução de duas etapas distintas: uma deveria favorecer o crescimento celular, atingindo altas concentrações e, ao mesmo tempo, assegurar baixa síntese de PHA; inversamente, na segunda etapa, o processo bloquearia o desenvolvimento celular e faria com que as células acumulassem o máximo possível de produto⁷. Para se obter alta densidade celular pesquisadores³⁵ propuseram um cultivo de *A. eutrophus* composto de duas etapas: a primeira, caracterizada por excesso da fonte de carbono (sacarose invertida) e outros nutrientes essenciais, através de bateladas sucessivas, resultando em um crescimento celular exponencial com velocidade específica máxima de crescimento de 0,32 h⁻¹, 25,8 g/L de biomassa, com baixo teor de polímero (6%) e produtividade em célula de 4,4 g/L h. Uma segunda etapa, consistia de uma batelada alimentada com vazão constante e limitação na fonte de carbono, procurando manter a produtividade máxima em células e oxigênio dissolvido acima de 15% da saturação. O resultado global levou à produção de 80,5 g/L de biomassa com 3,5% de polímero e produtividade em células de 3,1 g/L h^{35,36}.

Estudando as condições de produção de poli-β-hidroxibutirato (PHB) por *R. eutropha* em açúcar invertido sob limitação de nitrogênio³⁷, observou-se que a alimentação controlada de nitrogênio na fase de produção permite obter uma produtividade mais elevada (0,23 g/L h) que aquela obtida na cultura sob carência em nitrogênio (0,16 g/L h).

Outro aspecto relevante na produção de PHA é o fato que suas propriedades e aplicações dependem diretamente da massa molar e distribuição monomérica³⁸.

Foi estudada a influência do aporte de fonte de carbono na massa molar e no teor de PHB acumulado por *R. eutropha*^{20,39}. Ensaios permitiram determinar uma velocidade específica máxima de aporte de fonte de carbono (0,63 g_{açúcar}/g_{cel.res} h) para se alcançar uma massa molar máxima (1,3x10⁶ Da) com alta velocidade específica de acúmulo (0,16 g_{PHB}/g_{cel} h). A variação da concentração de fosfato e magnésio durante a fase de acúmulo também indicou a possibilidade de se melhorar o teor do PHB na célula e a massa molar do polímero produzido.

Na busca por matérias-primas alternativas de baixo custo para a produção de PHB, Marangoni e colaboradores⁴⁰ estudaram *R. eutropha* DSM 545 em frascos agitados, onde foram testados lactose hidrolisada, açúcar invertido e água de maceração de milho sob diferentes temperaturas (30 e 34 °C), sugerindo-se a água de maceração de milho como alternativa viável como fonte de nitrogênio.

Produção de PHB por outras linhagens bacterianas

Amostras de solo de canalial do estado de São Paulo foram coletadas e submetidas a uma metodologia então desenvolvida para isolamento e seleção de bactérias capazes de produzir PHB a partir de diversas fontes de carbono, tais como, sacarose, glicose, frutose³⁴. Cerca de 80 linhagens capazes de acumular polímero (PHA⁺) foram comparadas com linhagens de referência (*Alcaligenes eutrophus*, *A. latus*, *Pseudomonas saccharophila*), as quais utilizam sacarose com baixa eficiência de conversão a PHB ou são incapazes de utilizar diretamente este carboidrato⁴¹. A eficiência de conversão global de carboidratos (Y_{P/C}) em células e polímero foi comparada no sentido de selecionar linhagens de crescimento rápido e alta capacidade de acúmulo de PHA a partir destas fontes de carbono⁴². Duas linhagens destacaram-se, denominadas IPT044 e IPT 101, por serem boas produtoras de PHB a partir de sacarose, acumulando mais de 80% da biomassa celular na forma de polímero, com desempenho comparável ao da linhagem de referência, *A. eutrophus*, com a vantagem de hidrolisar eficientemente a sacarose⁴².

Estudos posteriores indicaram que IPT 101 se tratava de uma nova espécie, ou seja, tendo sido proposto o nome *Burkholderia*

*sacchari*⁴³. Tal resultado corrobora a importância do potencial biotecnológico da biodiversidade brasileira.

O uso do hidrolisado de bagaço de cana para a produção de PHB foi também estudado e, tanto *B. sacchari* IPT 101 como *B. cepacia* IPT 048, mostraram-se capazes de utilizar xilose e hidrolisado de bagaço produzindo PHB, com resultados bastante promissores quando comparados aos de outros trabalhos da literatura^{44,45}.

Em outro trabalho⁴⁶, foram oferecidas 30 diferentes matérias-primas à bactéria *B. sacchari*, avaliando-se a composição do polímero produzido. O principal homopolímero produzido foi PHB. Ácidos valérico e propiônico, álcool isopropílico e ácido nonanóico permitiram o acúmulo de unidades HV, além de HB, com possíveis traços de 3-hidroxixanoato, 5-hidroxivalerato, 4-hidroxivalerato e 4-hidroxibutirato, a partir de substratos relacionados. Como os produtos obtidos se mostraram diferentes, em muitos casos, daqueles relatados na literatura para *R. eutropha*, os autores sugeriram que pode haver diferenças metabólicas entre as duas espécies e que há necessidade de identificar melhor a PHA sintase de *B. sacchari*, bem como vias geradoras de hidroxiaçil-CoAs para a síntese de polímeros. Para isto, foram estudados mutantes de *B. sacchari* incapazes de acumular PHA, inserindo-lhes genes de *Wautersia eutropha* (*phaCB_{we}*), que restituíram a capacidade de acúmulo de PHA aos mutantes, indicando similaridade entre os genes das duas espécies⁴⁷.

Microorganismos capazes de acumular PHB foram também isolados de outras regiões do país. A partir de agroecossistemas de plantações de cana-de-açúcar do nordeste do Brasil, usualmente fertirrigados com vinhaça, foram isoladas 82 bactérias PHB⁺ utilizando derivados da cana, as quais pertenciam a 35 espécies diferentes, com grande incidência de *Pseudomonas*. Os isolados foram também avaliados quanto ao perfil de resistência a antibióticos, pelo método de diluição em meio de cultura sólido na presença de antibiótico, já que, uma vez conhecida a sensibilidade do microrganismo produtor, se pode selecionar os antimicrobianos a serem aplicados para combater contaminantes sensíveis⁴⁸. Esta abordagem foi refinada por outros autores, que, após determinarem a sensibilidade do organismo produtor em métodos convencionais (antibiograma e concentração mínima inibitória ou MIC), avaliaram o efeito destes antibióticos sobre a velocidade de crescimento e acúmulo do organismo produtor, com o intuito de selecionar melhor os produtos para o combate a contaminantes⁴⁹.

No sul do país, trabalhos de isolamento permitiram selecionar, a partir de cerca de 400 culturas obtidas de solo de floresta subtropical, uma espécie de *Ralstonia pickettii* capaz de acumular PHB em meio contendo 5% de melação ou 10% de sacarose⁵⁰.

Cerca de 50 linhagens de actinomicetos foram isoladas de solo e avaliadas quanto à capacidade de acúmulo de PHA a partir de fontes de carbono de baixo custo como sacarose, glicerina e amido, entre outras. Sete delas se destacaram, entre as quais *Streptosporangium* sp CC1J pela ampla capacidade de utilizar as fontes de carbono testadas. Alguns dos isolados foram capazes de acumular mais de 90% de sua biomassa em polímero, com predomínio de PHB⁵¹.

Foram também selecionadas duas linhagens produtoras de PHA a partir de triglicérides, submetidas à limitação de fosfato e nitrogênio. *Cupriavidus necator* apresentou fator de conversão de fonte de carbono em biomassa celular (Y_{Xr/C}) de 0,56 g/g, fator de conversão de fonte de carbono em polímero (Y_{PHB/C}) de 0,22 g/g e teor de polímero de 37% da biomassa e, *B. cepacia* com Y_{Xr/C} de 0,37 g/g, Y_{PHB/C} de 0,13 e teor de polímero de 34%⁵².

Uso de linhagens recombinantes

Na tentativa de ampliar o uso de matérias-primas diversificadas e reduzir o custo de produção do polímero, os genes de *A. eutrophus* DSM 545 foram introduzidos em linhagens de *E. coli* DH10B e JM101,

bactérias bastante conhecidas e de ampla capacidade de utilização de fontes de carbono. Os recombinantes assim construídos foram testados frente a fontes de carbono de baixo custo, tendo-se obtido os melhores resultados de acúmulo quando misturas de amido e soro de leite ou ainda amido, soro de leite e óleo foram empregadas, sendo as condições em que os recombinantes acumularam até 68% da massa celular na forma de polímero^{53,54}, o qual apresentou propriedades físico-químicas similares às encontradas na literatura para o PHB⁵⁵.

Linhagens recombinantes de *A. eutrophus* foram também obtidas no país, já que simultaneamente ao isolamento de novas linhagens, a partir dos anos 90, a outra linha de trabalho adotada no estudo pioneiro de produção de PHB a partir de sacarose de cana foi a construção de uma linhagem recombinante de *A. eutrophus*. Uma das limitações apresentada por essa linhagem era sua incapacidade de utilizar sacarose e, para a produção a partir de açúcar de cana ou melaço, como foi o modelo proposto inicialmente no país, seu uso seria inviável. Assim, foram desenvolvidos trabalhos para tornar esta linhagem capaz de utilizar a sacarose. Diversas bactérias são capazes de utilizar sacarose graças a um conjunto de genes organizados no que se denomina regulon-*scr*. Pesquisadores da Universidade de São Paulo inseriram o regulon-*scr* de *Salmonella typhimurium* em *A. eutrophus*, que se tornou capaz de crescer e acumular até 60% de sua biomassa na forma de PHB. Embora alguns parâmetros tenham se mostrado inferiores na linhagem recombinante (e.g. velocidade específica máxima de crescimento caiu de 0,30 para 0,24 h⁻¹) a biomassa alcançada permaneceu da mesma ordem que a da linhagem selvagem^{56,57}. Esta abordagem se mostrou muito mais efetiva que tentativas anteriores, feitas fora do país, para capacitar *A. eutrophus* ao consumo de sacarose. Com este mesmo objetivo, outros autores já haviam inserido genes de *Bacillus subtilis* codificadores da enzima levanase em *A. eutrophus*, que adquiriu a capacidade de hidrolisar a sacarose, porém apresentou crescimento limitado, quer pela baixa eficiência de transporte da sacarose para o interior da célula ou por incapacidade de secretar a levanase para o meio⁵⁸.

A obtenção de mutantes foi também empregada para estudo e controle da massa molar do PHB produzido por *B. sacchari*. Para isto, Filipov⁵⁹ desenvolveu uma estratégia para obter mutantes desta linhagem incapazes de reconsumir intracelularmente o polímero acumulado e sugeriu a presença de mais de uma via de degradação de PHA. Isto se torna relevante, tendo-se em conta que os grânulos de PHA acumulados pela bactéria constituem reservas intracelulares e que, portanto, devem ser degradados e reconsumidos intracelularmente em ausência de outra fonte de carbono para o seu crescimento ou manutenção. Por outro lado, há trabalhos que indicam que a síntese e a degradação de PHA são processos que ocorrem simultaneamente na célula, o que pode alterar a massa molar do polímero produzido⁶⁰. Sugere-se até que a alta massa molar de PHA acumulada por *Escherichia coli* recombinante, contendo genes de *A. eutrophus*, se deve à ausência de despolimerases nesta bactéria³¹. Tendo ainda em vista a facilidade de cultivo e velocidade de crescimento de *E. coli*, outra estratégia empregada para gerar ferramentas para modular a massa molar do polímero foi a inserção de genes da biossíntese de PHA de *Ralstonia eutropha* fusionados ao promotor pL do bacteriófago λ . O emprego de promotores fortes do bacteriófago λ permite que se faça o crescimento de *E. coli* e, aumentando-se em seguida a temperatura, seja induzida a expressão do gene sob o controle do promotor. Nestas condições, é desencadeada a síntese de PHA pois ocorre a inativação do repressor λcI_{857} que impedia esta síntese de PHA⁶¹.

A influência de rotas metabólicas na distribuição de pesos moleculares de PHA produzido por *A. latus* foi estudada, tendo sido implementadas duas rotas na forma de modelos estruturados e suas distribuições de pesos moleculares foram obtidas a partir de simulações, em batelada. Os resultados mostram que é possível correlacionar o mecanismo de polimerização enzimática com a

distribuição de pesos moleculares do polímero formado⁶².

Para controlar a composição do polímero, foram comparadas as seqüências de genes codificadores da enzima PHA sintase de *Chromobacterium violaceum*, *R. eutropha* e diversas *Pseudomonas*, propondo sítios a serem mutados no gene, modificando a especificidade da enzima para, assim, incorporar diferentes monômeros^{63,64}.

Uso de biorreatores alternativos para a produção de PHB

Os estudos de processo de produção comentados anteriormente foram baseados no uso de biorreatores com tanques agitados e aerados mecanicamente. Na busca por reatores alternativos para redução de custos da produção de PHA foram desenvolvidos trabalhos empregando reatores “airlift”. O desempenho de um reator “airlift” com circulação externa foi avaliado para a fase de crescimento de *R. eutropha* utilizando glicose. Obtiveram-se valores de velocidade específica de 0,16 h⁻¹ na fase exponencial de crescimento e fator de conversão de glicose em biomassa de 0,46 g/g, valores estes próximos aos obtidos em STR de 0,17 h⁻¹ e 0,49 g/g em condições semelhantes⁶⁵.

Para a fase de acúmulo, utilizando glicose e frutose, pH controlado em 7,0 e temperatura em 32 °C em um reator de 10 L de volume de trabalho, foram obtidos valores de velocidade específica de crescimento de 0,31 h⁻¹ e teores de polímero de cerca de 70% da biomassa ao final do experimento. A excreção de ácidos orgânicos (acetato e succinato) no acúmulo é citada para vazões de ar inferiores a 30 L/min (3 vvm), resultando em teores de PHB inferiores a 30% da biomassa⁶⁶. Em condições semelhantes, os resultados de tempo de mistura, transferência e consumo de oxigênio e parâmetros cinéticos foram comparados aos obtidos em reator agitado e aerado mecanicamente^{21,67-69}. No reator “airlift” para velocidade superficial de aeração de 10 m/s foram obtidos 50% de P3HB e produtividade de 0,6 g/L h. No tanque agitado, para o mesmo teor de polímero acumulado obteve-se 0,8 g/L h de produtividade. Apesar do maior valor de produtividade no tanque agitado, os valores de potência consumida mostram que no “airlift” menos energia é necessária para produção de PHB, colocando-o como uma boa alternativa ao tanque agitado.

Em outro estudo utilizando biorreator “airlift”, Pataquiva⁷⁰ estudou a hidrodinâmica e a transferência de massa na produção em batelada alimentada de poli-hidroxibutirato (PHB) por *B. sacchari* IPT 189. Transferência de oxigênio, tempo de mistura e “hold up” foram considerados para definir a melhor configuração do biorreator operado, utilizando projeto de experimento. Nas condições estudadas, os melhores resultados obtidos foram: velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{x_{max}}$) de 0,5 h⁻¹, biomassa total (Xt) de 150 g/L; 42% de PHB e produtividade (P_{PHB}) de 1,7 g/L h.

Outra forma de produção de PHB testada no país é o cultivo bacteriano em estado sólido, que permitiu a produção de PHA por *A. latus* e *A. eutrophus* a partir de torta de babaçu e torta de soja, rejeitos agroindustriais de baixo custo⁷¹. Trabalhos subsequentes citam valores de máxima conversão em polímero de 1,2 mg/g de meio em 36 h, quando torta de soja foi utilizada e 0,7 mg/g de meio com torta de babaçu em 84 h. A adição de 2,5 m/m de melaço de cana-de-açúcar à torta de soja aumentou a produção de PHB para 4,9 mg/g em 60 h, resultando em 39% de polímero na biomassa seca⁷². O uso de rejeitos de baixo custo para cultivos em estado sólido para a produção de biopolímeros foi também alvo de pedido de patente⁷³.

POLI-HIDROXIBUTIRATO-CO-HIDROXIVALERATO (PHB-CO-HV) – MELHORAMENTO DAS PROPRIEDADES DO POLÍMERO

Modificação genética do organismo produtor

Apesar de ser biodegradável e termoplástico, as propriedades

do homopolímero PHB fazem com que seja quebradiço, o que limita suas aplicações. A inserção de unidades de 3-hidroxicvalerato (HV), compostas por cinco átomos de carbono dá origem ao copolímero PHB-co-HV, com propriedades tais que lhe conferem maior maleabilidade. Embora existam linhagens bacterianas capazes de sintetizar PHB-co-HV a partir de carboidratos²⁵, elas apresentam baixa eficiência. Assim, processos de produção do copolímero economicamente viáveis são conseguidos apenas com o uso de precursores como ácido propiônico^{20,27}.

Um fator limitante para o uso de ácido propiônico para a produção de biopolímeros refere-se a seu custo, que se apresenta relativamente maior quando comparado a carboidratos, o que pode comprometer economicamente o processo⁷⁴.

Para verificar se outros co-substratos poderiam substituir o ácido propiônico, testou-se o uso de carboidratos combinados a ácidos e álcoois compostos de até 5 átomos de carbono, a fim de gerar unidades HV. Linhagens isoladas de solo no Brasil converteram maior variedade de substratos em HV que linhagens de referência e somente linhagens isoladas converteram isobutanol em HV⁷⁵. Entretanto, nenhuma destas fontes de carbono se mostrou mais adequada que os ácidos valérico ou propiônico. Duas das melhores linhagens isoladas, *B. cepacia* IPT 044 e *Burkholderia* sp IPT 101, foram cultivadas em biorreator, comparando-se sua capacidade de uso de sacarose e propionato para acúmulo de PHB-co-HV, utilizando-se o controle de pH e de oxigênio dissolvido como ferramentas de monitoramento e controle da produção. IPT 101 apresentou maior teor de polímero acumulado (66%), o dobro do fator de conversão de fonte de carbono em polímero (0,37 g/g), com a vantagem de não ser patogênica^{12,14}. Entretanto, da mesma forma que bactérias obtidas em coleções de culturas, os dois isolados demonstraram eficiência na conversão de propionato em unidades HV correspondendo a menos de 10% do valor máximo teórico¹².

O valor máximo teórico foi estimado considerando-se que, para a síntese do co-polímero, o propionato entraria na forma de propionil-CoA, a ser condensado com uma molécula de acetil-CoA, oriunda da degradação do carboidrato. Ou seja, cada molécula de propionato seria integralmente incorporada à unidade HV em formação, de modo que seriam gerados 1,35 g de HV por grama de propionato fornecido^{12,24}, valor correspondente ao fator de conversão máximo teórico de propionato a HV ($Y_{HV/prp}$). O baixo valor de $Y_{HV/prp}$ observado para todas as linhagens investigadas foi indicativo da presença de outras vias metabólicas que atuariam competitivamente com a via de síntese de HV⁷⁶, direcionando o propionato para gerar biomassa, energia e CO₂. Para aumentar esta eficiência, buscou-se o melhoramento genético de algumas linhagens e o emprego de estratégias de condução do processo de produção em biorreator (estratégias de alimentação, uso de indutores ou de diferentes proporções entre as matérias-primas oferecidas etc.).

No que se refere à obtenção de mutantes mais eficientes no uso de propionato, *A. eutrophus* DSM 545 foi submetida à mutação, por meio de irradiação ultravioleta, gerando o mutante UV1, incapaz de crescer em propionato (prp), porém mais eficiente na sua conversão a unidades HV. Este mutante passou a produzir um copolímero PHB-co-HV com um teor de 37,3% de unidades HV, sem prejuízo da capacidade de acúmulo total de PHA, enquanto a linhagem selvagem apresentava um teor de 8,5%. Ambas as linhagens acumularam teores totais de PHA similares (c.a 37% da biomassa celular)^{57,77}.

Mutantes prp também foram obtidos a partir da linhagem de *B. sacchari* IPT 101 selecionada nos trabalhos iniciais de produção de PHA a partir de sacarose^{14,20,43,76,78}. Dois grandes grupos de mutantes prp foram identificados: aqueles deficientes na utilização de intermediários da α -oxidação e outros não afetados na utili-

zação desses intermediários. Mutantes afetados na utilização de intermediários da α -oxidação consumiram todo ácido propiônico suprido, acumularam PHA contendo menos que 30 mol% de unidades HV e atingiram fatores de conversão de propionato em unidades HV ($Y_{3HV/prp}$) da ordem de 0,35 g/g. Mutantes do segundo grupo consumiram apenas parte do propionato suprido, acumularam PHA contendo mais que 50 mol% de unidades HV e atingiram valores de $Y_{HV/prp}$ da ordem de 0,80 g/g, observado no mutante IPT 189. Embora até 8 vezes mais eficientes na produção de HV, os valores de $Y_{HV/prp}$ ainda se mostravam inferiores ao máximo teórico. Estes resultados, associados ao fenótipo observado para os dois grupos de mutantes, bem como a estudos moleculares da linhagem, levaram à proposição da existência de duas vias de catabolismo de propionato em *B. sacchari*: a α -oxidação e o ciclo de 2-metilcitrato (2MCC) que, quando ativas, competiriam pelo substrato com a síntese de HV^{20,76,79}; ao serem deletadas, levaram ao melhoramento observado nos mutantes.

Quando testados frente ao ácido valérico, os mutantes de *B. sacchari* afetados no 2MCC apresentaram valores mais altos que a linhagem selvagem no fator de conversão de valerato a unidades HV, um deles atingindo o valor máximo teórico esperado para esta fonte de carbono (0,97 g/g), indicando que deve haver várias rotas para suprir R-3-hidroxicvaleril-CoA para a biossíntese de PHB-co-HV a partir de valerato, assim como a relevância do 2MCC⁸⁰.

O 2MCC é hoje a única via catabólica de propionato descrita com base molecular para *B. sacchari* e outras bactérias produtoras de PHA^{81,82}. Estudos recentes têm se voltado à construção de cassetes de mutação para inativação sítio específica de genes desta via, de modo a se obter linhagens recombinantes capazes de alcançar a eficiência máxima teórica de produção de HV a partir de propionato, tendo sido gerados mutantes que produzem maiores percentuais de HV que a linhagem selvagem^{83,84}.

Melhoramento do processo de produção de PHA em biorreator

Para melhorar a produção de PHB-co-HV, diversas estratégias de engenharia bioquímica também foram estudadas. Já em 1996, foi obtido um aumento na produção do copolímero PHB-co-HV por *A. eutrophus*, alimentando-se a cultura com fonte de nitrogênio de forma linear ou exponencial, possibilitando um crescimento bacteriano residual durante a fase em que o acúmulo do biopolímero foi predominante⁸⁵. As produtividades alcançadas nesse estudo foram de 0,72 g/L h e a porcentagem molar de HV no PHA variou entre 10,4 e 13,1%.

A produção de PHB-co-HV por *A. eutrophus* DSM545 sob diferentes condições de oferta de substratos foi estudada, atingindo melhor desempenho em condição de limitação em hexoses e não limitação em ácido propiônico. A maior vazão específica de alimentação de hexoses testada resultou em produtividade em copolímero de $P_{PHA}=0,10$ g/g/h e altos fatores de conversão: $Y_{3HV/Prop}=0,40$ g/g, $Y_{3HB/S}=0,35$ g/g e $Y_{3HA/C}=0,36$ g/g. Assim, alterando-se a condição de oferta de substratos foi possível quadruplicar o fator de conversão de ácido propiônico em unidades 3-hidroxicvalerato e dobrar a produtividade em polímero em relação ao melhor resultado descrito na literatura, utilizando ácido propiônico como co-substrato^{15,86,87}.

O crescimento de *A. eutrophus* foi utilizado como modelo para verificar a necessidade de correção de dados experimentais utilizados no cálculo de velocidades específicas e coeficientes de rendimento⁸⁸. Esta correção é necessária, pois nem sempre é considerado que com a retirada de amostras ao longo de um processo, há variações no sistema além da variação de volume (substratos e produtos também são alterados). O erro destes parâmetros torna-se signifi-

tivo, podendo causar problemas quando da formulação e do ajuste de parâmetros do modelo matemático, ou mesmo quando for utilizado em escala industrial. Considerando este fato, modelos matemáticos do processo de produção de PHB-co-HV foram propostos por vários autores^{17,89-91}, que propuseram modelo fenomenológico estruturado cibernético para o processo de produção de copolímeros de poli-hidroxicanoatos em biorreator por *A. eutrophus*. Modificações foram feitas nesse mesmo modelo para estudos de otimização do processo, nos quais foram analisados os dados experimentais obtidos em biorreator empregando a estequiometria da via metabólica de produção de PHA por *A. eutrophus*^{16,92,93}.

Foi apresentada uma nova metodologia de construção de dois estimadores de estados, um fenomenológico e um neural⁹⁴. A comparação do desempenho dos mesmos foi feita utilizando-se dados experimentais do processo de produção de PHB-co-HV por *A. eutrophus*. Demonstrou-se que redes neurais são uma ferramenta eficiente como estimadores de estado de sistemas dinâmicos não lineares multivariáveis.

Estudou-se ainda o comportamento da massa molar do polímero produzido por *A. eutrophus* utilizando glicose, frutose e ácido propiônico como fontes de carbono e formas diferentes de aporte dos mesmos: fornecimento a uma vazão constante (0,15 g de fonte de carbono/g de célula.h) ou através do controle de pH⁹⁵. Verificou-se que em uma mesma faixa de teores de PHB-co-HV acumulado, o valor da massa molar é pelo menos duas vezes superior no caso em que a fonte de carbono é alimentada pelo controle de pH. Observou-se também que, nesse caso, o teor de polímero acumulado não ultrapassa 60% e o valor da massa molar sofre uma queda brusca, aproximando-se dos valores obtidos no outro caso, cuja massa molar permaneceu aproximadamente constante ao longo do ensaio em torno de 7 a 8.10⁵ Da.

O uso de ácido oléico (0,3 g/L) como suplemento nutricional na produção de PHB-co-HV por *R. eutropha* foi estudado, em conjunto com açúcar (30g/L) e ácido propiônico (1g/L)⁹⁶. A produção de polímero foi aumentada de 18,3 para 28,3%, embora a fração de unidades HV tenha se mantido constante nas culturas com e sem adição de ácido oleico. Estudos posteriores utilizaram glicose e frutose como substratos e alimentação de fosfato e ácido propiônico na fase de produção, bem como ácidos oleico e linoleico adicionados no início da fase de produção, na concentração de 0,3 g/L. O uso destes suplementos aumentou em 11% a produção de polímero, que foi maior para a cultura na qual foi utilizada a mistura de ácido linoleico/oléico (2:1 v/v), obtendo-se um acúmulo de 57,1% de PHB-co-HV¹¹.

Soro de leite e açúcar invertido foram também oferecidos a *R. eutropha* como fontes de carbono, com posterior adição de ácido propiônico, pelo controle de pH e na forma de pulsos. O acúmulo do copolímero ocorreu sob limitação de nitrogênio e fósforo. Os melhores resultados foram obtidos quando as adições foram realizadas por pulsos obtendo-se 1,46 g de HV em 3,93 g de polímero acumulado (37%) com conversão de 0,22 mol/mol atingindo na fase de acúmulo máxima produtividade de 0,17 g/L h⁹⁷.

A produção e caracterização de PHB-co-HV também foram estudadas utilizando *R. eutropha* e resíduo da indústria de arroz. Os ensaios foram realizados em incubador rotativo onde o acúmulo do copolímero foi induzido pela limitação em nitrogênio, resultando em 26,6% de PHB-co-HV com 7-9% de HV e com produtividade de 0,12 g/L h⁹⁸. O efeito da alimentação de fosfato na produção do mesmo copolímero por *R. eutropha* DSM 545 também foi objeto de outro estudo, onde a manutenção de uma baixa velocidade de crescimento celular durante a fase de produção do copolímero no biorreator resultou em 98,2 g de biomassa com 63% de copolímero e produtividade igual a 1,36 g/L h¹¹.

Recentemente, foram realizados estudos da modulação da composição monomérica de poli-hidroxicanoatos através da manipulação do fluxo de entrada dos substratos para cultivos em biorreator. Para *B. sacchari* IPT 189, a síntese de unidades HV no copolímero PHB-co-HV guardou uma relação diretamente proporcional entre o consumo de ácido propiônico e a velocidade de produção de HV em um intervalo entre 6 até 40 mol% de unidades HV no copolímero. Altos rendimentos de ácido propiônico em unidades HV foram obtidos ($Y_{HV/prop} = 1,25; 1,27$ e $1,34$ g/g) variando-se a relação de sacarose e ácido propiônico durante a fase de acúmulo, valores estes muito próximos do estequiométrico para estas conversões⁹⁹.

Foram realizados¹⁰⁰ estudos buscando a caracterização da massa molar do copolímero PHB-co-HV produzido por *B. sacchari* IPT 189. As massas moleculares obtidas foram da ordem de 500 a 1600 kDa, com valores decrescentes com o acúmulo de polímero e uma tendência menor de queda para as maiores vazões de alimentação testadas.

POLI-HIDROXIBUTIRATO (PHB) E POLI-HIDROXIPENTENOATO (PHPE)

Poli-3-hidroxi-4-pentenoato (PHPE) é um polímero constituído de unidades monoméricas curtas (5 carbonos) com uma insaturação na sua cadeia lateral. Foi o primeiro homopolímero de cadeia insaturada descrito na literatura. As propriedades físicas deste biopolímero são diferentes daquelas apresentadas pelo homopolímero PHB e pelo copolímero PHB-co-HV, sendo menos cristalino e tendo temperatura de fusão mais baixa¹⁰¹.

Mais uma vez, a biodiversidade brasileira se destaca pelo isolamento de uma espécie, *Burkholderia* sp IPT 064 (recentemente *B. cepacia*), capaz de acumular polímeros com monômeros insaturados a partir de carboidratos, ou seja, sem o fornecimento de substrato com estrutura química diretamente relacionada à do produto^{75,102}. Esta linhagem, bem como outras dez isoladas de solo e produtoras de poli(HB-co-HPE) foram comparadas com relação aos fatores de conversão de substratos em polímero ($Y^{GP/S}$). As melhores linhagens foram avaliadas com relação aos valores de velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{x,max}$) e quanto à conversão de ácido pentenóico em unidades HPE. Três linhagens, IPT 084, IPT 083 e IPT 076, destacaram-se pelos maiores valores de $Y^{GP/S}$ 0,27; 0,29 e 0,30 g/g, respectivamente. Já os seus valores de μ_{max} foram, respectivamente, 0,24; 0,30 e 0,39 h⁻¹, sendo estes valores comparáveis àqueles obtidos pelas linhagens *A. eutrophus*¹⁰³. Entretanto, em nenhuma delas foi possível aumentar a fração de HPE (5%) pelo fornecimento do ácido 3-hidroxi-4-pentenoato, que foi convertido a unidades HV.

Para aumentar a fração de HPE produzida por *B. cepacia* IPT 046 foram também desenvolvidos estudos de melhoramento genético e após inativação de uma PHA sintase (codificada pelo gene *phaC_{1bc}*) ainda se observou capacidade de acúmulo, embora menor que a original, com aumento da fração HPE. Formulou-se então, a hipótese de que a linhagem possui mais de uma PHA sintase, acumulando PHB e PHPE em grânulos intracelulares distintos, de modo que o produto purificado seria uma blenda (PHB-b-HPE)^{104,105}. Após a seleção de clones derivados de *B. cepacia* IPT064 adaptados ao crescimento em ácido 4-pentenóico (HPE), foram obtidos mutantes afetados no uso deste ácido, bem como no uso de ácido 10-undecenóico, sem prejuízo do consumo de ácidos saturados, como propiônico e valérico. Esta mutação não foi capaz de promover o aumento da fração HPE no polímero acumulado pelas bactérias, mas houve uma redução na incorporação de unidades HV. Foi sugerido que o ácido 4-pentenóico não é um precursor direto do monômero HPE, mas seria convertido a HV. Foi observada a pro-

dução de unidades HB, HV e HPE a partir de sacarose e ácido 4-pentenóico nestas linhagens. A forma de organização destes monômeros (copolimerizados dois a dois, termpolimerizados ou polimerizados uniformemente), bem como a presença de mais que uma PHA sintase são hipóteses ainda a serem confirmadas¹⁰⁶.

Estudos em biorreator demonstraram que pH e temperatura influenciam a velocidade de síntese das unidades de HB e HPE. Foram obtidos valores máximos de HPE em relação ao total de polímero produzido de cerca de 4,4% (m/m) a 30 °C e pH 7,0, utilizando sacarose como única fonte de carbono e limitação de nitrogênio para síntese de PHA por *B. cepacia* IPT 064 (DSMZ9242). A influência da vazão de alimentação de sacarose durante a fase de produção de PHA mostrou que a maior velocidade de síntese de unidades HPE foi alcançada quando uma maior limitação de fonte de carbono foi imposta, atingindo 8,5% (m/m) de HPE no polímero produzido¹⁰⁷.

POLI-HIDROXIALCANOATOS COM MONÔMEROS DE CADEIA MÉDIA (PHAmcl)

A partir dos avanços na produção de PHA com monômeros de cadeia curta (PHAscl), como PHB, PHB-*co*-HV e PHB-*b*-HPE ficou evidente a importância da necessidade de diversificação da composição monomérica dos PHA, já que as propriedades destes materiais dependem em grande parte desta característica. Uma vez que se consiga, por meio de diversas ferramentas, controlar a composição monomérica, espera-se produzir PHA sob medida para diferentes aplicações. Neste cenário, destacam-se os PHAmcl, PHA compostos de monômeros de cadeia média, ou seja, contendo entre 6 e 14 átomos de carbono (Figura 2) que apresentam propriedades distintas dos PHAscl. Enquanto os de cadeia curta se assemelham aos plásticos, como o polietileno, os PHAmcl apresentam propriedades elastoméricas, assemelhando-se à borracha. Podem ser produzidos tanto a partir de carboidratos como de diversos compostos alifáticos por microrganismos, especialmente bactérias do gênero *Pseudomonas* pertencentes ao grupo I de homologia do RNA ribossomal^{108,109}.

Inicialmente, esperava-se que o uso de ácidos graxos fosse a forma mais interessante de produzir e controlar a composição destes materiais pelo fato de que a composição do poliéster refletia o comprimento da cadeia carbônica da fonte oferecida, ou seja, quando a principal fonte é o ácido nonanóico; por exemplo, *P. oleovorans* produz PHAmcl composto predominantemente de 3-hidroxi-nonanoato. Entretanto, a partir da década de 90 descobriu-se que um grupo de *Pseudomonas* acumulava PHAmcl a partir de carboidratos. Quando produzidos a partir de carboidratos, PHAmcl apresentam o ácido 3-hidroxi-decanóico (HD) como principal constituinte e outros monômeros podem ser detectados. Além disso, comparações do custo mínimo da fonte de carbono para produção de PHAmcl a partir de carboidratos e óleo de soja indicaram valores muito próximos¹¹⁰.

Embora as primeiras publicações acerca da produção de PHAmcl datem de 1998¹¹¹, diversas bactérias foram anteriormente isoladas de solo brasileiro^{12,34} e apenas posteriormente se verificou que o polímero por elas produzido era PHAmcl¹¹⁰⁻¹¹².

Mais recentemente, bactérias isoladas de solo de Mata Atlântica foram avaliadas quanto à produção de ramnolipídios e PHAmcl. Dentre os isolados, 26 produziram biosurfactante aniônico e 57 PHA. Algumas linhagens sintetizaram simultaneamente biosurfactante e PHA¹¹³.

Ensaios na busca de linhagens produtoras de PHAmcl a partir de óleos vegetais também foram realizados com os óleos de soja, arroz, canola, milho e girassol como fonte de carbono em incubador rotativo, revelando a presença de monômeros contendo insaturações¹¹².

Bactérias previamente isoladas capazes de acumular PHAmcl a partir de carboidratos foram testadas e comparadas com a linhagem de referência *P. putida* KT2440. A análise metabólica de vias envolvidas na oxidação de carboidratos e na biossíntese do polímero permitiu estabelecer uma equação para cálculo da eficiência máxima teórica. Quando comparadas à linhagem de referência com relação ao uso de carboidratos para produzir PHAmcl, uma delas (*P. putida* IPT 046) se destacou com o acúmulo de PHAmcl correspondendo a cerca de 60% da massa seca celular e fator de conversão do substrato em produto de 0,16 g/g, correspondendo a cerca de 60% da eficiência máxima teórica¹¹⁰. Essa mesma linhagem foi também estudada quanto à produção de PHAmcl a partir de carboidratos, tendo seu produto sido caracterizado quanto à massa molar, composição monomérica, estrutura, cristalinidade e propriedades térmicas. Em cultivo em batelada alimentada, foram obtidos 14 g/L de biomassa com cerca de 40% de PHA, tendo sido observados valores de $Y_{X/C} = 0,35$ g/g, durante o crescimento e $Y_{PHAmcl} = 0,20$ g/g. Sua composição foi de basicamente hidroxidecanoato (60-70%) e hidroxi-octanoato (20-25%), e cerca de 6% de monômeros com uma dupla ligação não terminal. A massa molar média alcançada foi de 223 kDa e 24% da fase sólida cristalina. O polímero apresentou baixa temperatura de transição vítrea (-37,9 °C), ponto de fusão de 56 °C, termicamente estável (243 °C) e propriedades termomecânicas apropriadas para uso potencial em filmes para embalagens¹¹⁴.

Cultivos a alta densidade celular de *P. putida* IPT 046 foram realizados, empregando glicose e frutose como fonte de carbono. Foi obtido 0,65 h⁻¹ de velocidade específica máxima de crescimento. Houve limitação e inibição do crescimento a concentrações de nitrogênio de 400 e 3500 mg de NH₄⁺/L, respectivamente. Para a obtenção de altas densidades celulares, foram testadas diferentes estratégias de condução do processo de batelada alimentada. A alimentação por pulsos, seguida de alimentação da vazão constante resultou em 32 g/L de concentração celular em 18 h de cultivo, com baixos teores de PHAmcl. A alimentação constante resultou em 35 g/L de biomassa em 27 h e 15% de PHAmcl. Já a alimentação exponencial levou à formação de 30 g/L de biomassa em 20 h com baixo teor de polímero. Utilizando esta última estratégia para crescimento celular e limitação em nitrogênio para acúmulo de polímero, 40 g/L de biomassa foram obtidos com 21% de PHAmcl em 34 h. A limitação em fosfato gerou 50 g/L de biomassa com 63% de PHAmcl em 42 h, com produtividade de 0,8 g/Lh¹¹⁵.

Cultivos contínuos em biorreator sob limitação múltipla de nutrientes com a mesma linhagem (*P. putida* IPT04) foram realizados com valores de vazões específicas de alimentação (D) entre 0,05 e 0,5 h⁻¹, utilizando glicose e frutose como fontes de carbono; os nutrientes estudados foram nitrogênio (N), fósforo (P) e a fonte de carbono (C). As relações C/N testadas variaram entre 10 e 50 g/g e C/P entre 70 e 350 g/g. Os resultados obtidos mostraram valores crescentes de biomassa para valores decrescentes de D, atribuído ao acúmulo de PHA, também crescente com D. Nas condições testadas, o teor máximo de PHA obtido foi de cerca de 60%, com fator de conversão de fonte de carbono em PHA de cerca de 0,16 g/g¹¹⁶.

Visando modificar a composição monomérica de PHAmcl avaliou-se o fornecimento concomitante de glicose e frutose com ácidos acético ou propiônico e o polímero produzido por três linhagens bacterianas. Observou-se o efeito inibitório dos dois ácidos quando fornecidos a partir de 1 g/L, com redução da capacidade de consumo do carboidrato. Foram observadas modificações na composição do polímero apenas quando produzido pela linhagem *P. putida* IPT 046 pois monômeros ímpares foram incorporados (hidroxinonanoato e hidroxipentenoato)¹¹¹. Outro estudo de modificação da composição de PHAmcl combinou carboidratos a ácido propiônico ou ácido acrílico. Embora a incorporação de monômeros

ímpares tenha ocorrido apenas a partir de ácido propiônico nestas condições, a eficiência foi baixa, direcionando menos que 10% do propionato para este fim¹¹⁰. Para melhorar esta eficiência foram obtidos mutantes incapazes de utilizar o propionato para crescimento, mas não para o acúmulo, empregando o transposon mini*Tn5*. Em presença de apenas glicose e frutose, um dos mutantes obtidos (IPT 693) produziu um PHAmcl cuja composição monomérica apresentou menor fração de 3-hidroxi-octanoato (HO) e 3-hidroxi-decanoato (HD) que a linhagem selvagem. Quando glicose, frutose e ácido propiônico foram fornecidos a este mutante, observou-se uma completa modificação na composição monomérica do PHA, com significativo aumento de unidades ímpares: 10 mol% de 3-hidroxi-heptanoato (HHp) e 90 mol% de 3-hidroxi-nonanoato (HN), o que mostrou ser possível o controle da composição monomérica destes materiais para modificar suas propriedades e aplicações¹¹⁷.

Óleos vegetais também têm sido testados como matérias-primas para a produção de PHAmcl. A presença de cadeias insaturadas nos ácidos graxos componentes do óleo vegetal podem gerar monômeros insaturados no PHAmcl obtido, cuja presença permite modificações químicas posteriores que incorrerão em propriedades diferentes¹¹⁸. PHAmcl com distintas composições foi produzido a partir dos óleos de arroz, canola, girassol, milho e soja. Em todos os polímeros sintetizados foi possível verificar a presença de monômeros insaturados, alguns dos quais, após extração, purificação e armazenamento formavam ligações cruzadas¹¹⁹.

Linhagens que acumulavam PHAmcl a partir de carboidratos também foram bem eficientes quando óleos vegetais foram fornecidos. Duas linhagens, *P. putida* (IPT 046) e *P. aeruginosa* (IPT 171), apresentaram PHA com composição monomérica diferente, evidenciando mais uma vez a importância do microrganismo no processo de produção. Quando diferentes proporções de ácido oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) foram fornecidas para *P. putida*, observou-se a existência de uma correlação linear entre a concentração de ácido oleico fornecida e a fração molar de 3-hidroxi-dodecanoato (HDd) obtida¹¹⁷. Tais resultados evidenciam boas perspectivas para o controle da composição e propriedades dos PHAmcl.

Para estudar o uso de ácidos graxos na produção de PHAmcl com composição variada, genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha* foram também introduzidos em linhagens de *E. coli* afetadas no metabolismo de ácidos graxos, avaliando-se a especificidade da enzima PHA sintase¹²⁰. Observou-se a formação de poli(3-hidroxi-butanato-co-3-hidroxi-octanoato) (PHB-co-HO) e poli(HB-co-HO-co-hidroxi-dodecanoato) (HDD), quando octanoato e decanoato ou dodecanoato foram fornecidos como fontes de carbono. A caracterização da PHA sintase de *R. eutropha* foi também realizada do ponto de vista molecular, empregando-se evolução *in vitro* e mutação sítio-dirigida, o que permitiu propor modelos para a proteína em questão¹²¹.

Ainda utilizando *E. coli*, foram inseridos nas linhagens DH10B e JM101 os genes de biossíntese de PHAmcl de *P. aeruginosa*. As linhagens recombinantes assim obtidas tiveram o seu crescimento avaliado frente a fontes de carbono de baixo custo (amido de milho hidrolisado, óleo de soja e soro de queijo), com a adição de ácido acrílico como inibidor da β -oxidação de ácidos graxos. Foram também testadas frente a óleos vegetais (1% de óleo de algodão, arroz, canola, dendê, girassol, milho, oliva, ou soja) combinados a soro (5%). O maior acúmulo de PHA (cerca de 12%) foi obtido quando azeite de dendê foi testado⁵³.

SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PHA

Estima-se que o impacto do custo de recuperação de PHAs no custo total do processo de produção pode variar em até 50% do

valor do produto, dependendo de variáveis como o processo de separação empregado e o teor de PHA acumulado na biomassa¹²².

No Brasil, foi desenvolvido um método de recuperação de PHB utilizando álcoois superiores com cadeia superior a três carbonos e seus ésteres, como álcool isoamílico, acetato de amila, acetato de isoamila e óleo fúsel, resíduo do processo de produção de etanol. A biomassa era submetida a estes solventes a alta temperatura, solubilizando o polímero na fase orgânica, seguindo-se a remoção dos restos celulares por filtração e precipitação do polímero na massa de solvente por resfriamento da solução, com remoção do solvente e secagem³³. Esta tecnologia está sendo utilizada atualmente em escala industrial²². Este processo foi recentemente modificado por inserir, após a precipitação do polímero, uma etapa de concentração da suspensão polímero/solvente através de sua passagem por um equipamento de microfiltração¹²³. Um processo de recuperação do polímero através do tratamento da biomassa com uma mistura composta de um solvente e um não-solvente do PHA também está descrito na literatura¹²⁴. A recuperação do material polimérico se fazia através da precipitação do polímero na fase não-solvente quando o solvente era removido da solução.

Outro estudo importante a ser destacado é a influência da pressão de operação, do número de passagens e da concentração celular no rompimento celular de biomassa de *R. eutropha* DSM 545 utilizando homogeneizador APV-Gaulin¹²⁵. Nele, os autores concluíram que as variáveis pressão e número de passagens eram importantes no rompimento celular e que este método é potencialmente interessante para recuperação de PHB da biomassa microbiana.

A vantagem do uso de solventes reside na alta pureza do produto (>99%), porém há o inconveniente de envolver o uso de grandes quantidades de solventes e não-solventes orgânicos¹²⁶ e o uso de temperaturas elevadas (acima de 100 °C), que podem reduzir a massa molar do produto, alterando suas propriedades^{22,33}.

Buscando métodos mais brandos, observou-se que o tratamento enzimático de biomassa seca de *R. eutropha* suspensa em água com enzimas proteolíticas comerciais de origem bacteriana (Savinase® e Esperase®) elevou o grau de pureza do polímero de 70 para até 90% em massa seca da biomassa¹²⁷. Estudou-se o tratamento ácido após a lise enzimática das células para precipitação e separação da biomassa, tendo se observado que a pH 3,0 o arraste das proteínas residuais foi reduzido, sugerindo que este mecanismo poderia aumentar a pureza do produto obtido¹²⁸. Após a seleção de enzimas para a lise celular, os melhores resultados de purificação da biomassa de *R. eutropha* DSM 545 com 75% de PHB foram alcançados com bromelina (2% em massa em relação à biomassa, 89% de pureza do produto) e com pancreatina (90% de pureza do produto)^{129,130}.

Um outro processo de separação de PHA, que consistia na diminuição da fonte biológica que contém o material pelo emprego de enzimas, seguido da suspensão do material e subsequente separação do PHA de outros componentes da biomassa utilizando fracionamento centrífugo, também está descrito na literatura¹²⁴.

CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES

Uma série de usos e aplicações tem sido apontada para os PHA, visando o seu uso como substituto dos plásticos convencionais, na sua grande maioria, de peças feitas por termoformagem e injeção em moldes, filmes extrudados, fios, entre outros, com a vantagem de serem biodegradáveis em ambientes microbiologicamente ativos. Graças às suas características de biocompatibilidade, na área médica são apontadas aplicações em fios de sutura, moldes para engenharia de tecidos e matrizes para a liberação controlada de fármacos. Entretanto, essas aplicações dependerão das proprieda-

des físicas do PHA; que, por sua vez, dependem da composição monomérica e do tamanho de sua cadeia¹³¹.

No Brasil, a partir do desenvolvimento dos processos de produção, evidenciou-se a necessidade de estudos das propriedades dos materiais gerados e do desenvolvimento de novas formulações para viabilizar a aplicação efetiva dos PHA. Alguns destes esforços estão descritos a seguir.

O comportamento térmico e morfológico do PHB foi avaliado, tendo-se observado que a temperatura de processamento de PHB influenciou a massa molar do produto obtido¹³². O polímero é bastante sensível à degradação termomecânica a temperaturas acima de sua fusão. Nestas condições de processamento, há significativa mudança nas temperaturas de fusão, cristalização e transição vítrea. A diminuição da massa molar altera significativamente a taxa de crescimento e o tamanho dos esferulitos de PHB.

Do mesmo modo, verificou-se que o polímero tem tendência à degradação, dependendo de seu histórico de processamento. Foi observada redução da temperatura de cristalização proporcional ao número de etapas de processamento térmico a que o PHB era submetido¹³³.

Foi estudada a preparação e a caracterização de compósitos de PHB com fibras naturais, a saber, farinha de madeira (*Pinus elliotti*), amido de fécula de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar e polpas celulósicas obtidas deste bagaço, na proporção de 30% em massa das fibras na mistura com o polímero. Os compósitos de farinha de madeira e bagaço tiveram um pequeno decaimento nas propriedades mecânicas em tração com relação ao PHB puro. Já os reforçados com polpa de celulose apresentaram alto desempenho quanto ao alongamento na ruptura em comparação ao polímero natural e aos demais compósitos, principalmente a polpa de bagaço pré-hidrolisado¹³⁴. Compósitos de PHB com amido¹³⁵ também foram estudados por estes autores variando-se o teor de amido entre 10 a 40% em peso do compósito, concluindo-se que o amido pode ser utilizado de maneira satisfatória como reforço de PHB, visto que a incorporação de até 20% de amido ao polímero não apresentou prejuízo das propriedades mecânicas em relação polímero puro. Acima deste teor observou-se comprometimento das propriedades mecânicas. Quando comparados com outros reforços estudados (bagaço de cana e lignina), as propriedades mecânicas foram superiores às observadas com amido. Uma comparação dos resultados destes dois trabalhos com o polímero polipropileno (PP) puro ou carregado com talco a 20 e 40% em peso do compósito mostrou que os compósitos com amido possuíam propriedades mecânicas inferiores ao PP puro, mas semelhantes ao PP carregado com talco. Por outro lado, PHB carregado com 30% de polpa de celulose de bagaço pré-hidrolisado possuía propriedades mecânicas semelhantes ou mesmo superiores ao PP puro.

O acúmulo e a caracterização térmica de PHB sintetizado por *Ralstonia eutropha* a partir de sacarose hidrolisada e suplementada com óleos vegetais indicou que a suplementação de óleos não influenciou o crescimento celular. O polímero sintetizado apresentou estabilidade térmica ligeiramente superior à do PHB industrial, ambos apresentando temperatura de fusão muito próxima, 175 e 168 °C, respectivamente. Os autores concluíram que existe similaridade no grau de cristalinidade dos dois polímeros estudados, o que implica que a taxa de degradação de ambos tende a ser próxima¹⁰.

Blendas de PHB com amido natural, amido adipato e derivados uretanos de amido foram também preparados e caracterizados; entretanto, nos dois primeiros casos, os materiais resultantes ainda se mostraram bastante quebradiços¹³⁶.

Com o objetivo de se obter PHB com massa molar controlada e hidroxilas nas duas terminações, testou-se a sua transesterificação com um diol, por catálise ácida. O protocolo estabelecido mos-

trou-se bastante eficiente para introdução de hidroxilas terminais. O produto obtido apresentou massa molar bastante inferior à do polímero puro, obtendo-se também redução da temperatura de transição vítrea e de fusão do polímero funcionalizado¹³⁷.

Visando o melhoramento das propriedades físicas do polímero foi estudada a adição de diversos tipo de plastificantes em PHB, concluindo-se que os que mais contribuíram para melhoramento das propriedades físicas foram triacetil glicerol a 30% em peso do polímero e uma mistura de binária de poliadipato (20% m/m) e triacil glicerol (10% m/m)¹³⁸.

PHB e PHB-co-HV parcialmente degradados e *trans*-esterificados foram caracterizados visando adequar suas propriedades como matrizes para liberação de substâncias. Estes materiais foram usados para compor microcápsulas em emulsão dupla, contendo hormônios luteinizante e folicúlo estimulante, estudando-se os perfis de liberação dos mesmos¹³⁹. Microesferas de PHB e PHB-co-HV foram avaliadas para verificar a influência do próprio material, bem como das condições de processamento sobre as propriedades finais das microesferas produzidas, tendo-se observado que os fatores mais influentes sobre o tamanho da partícula formada foram a concentração de surfactante na fase aquosa da emulsão, bem como a composição do solvente¹⁴⁰.

Micropartículas de PHB encapsulando tionicotinamida (TNA), para o tratamento da doença de Chagas, foram formuladas por simples emulsão, dupla emulsão e "spray drying". A efetividade na encapsulação por essas técnicas foi dependente da solubilidade crítica da droga e da característica hidrofóbica da matriz. As micropartículas obtidas por simples e dupla emulsão, a 10 °C, foram as que apresentaram baixa carga efetiva, 2,2 e 3,2%, respectivamente. Entretanto, as micropartículas de "spray drying" atingiram 6,2% e o rendimento da dupla emulsão foi mais elevado (76,3%)¹⁴¹.

Foram também realizados estudos de alguns PHA voltados à sua aplicação em compósitos de hidroxiapatita. Um dos compósitos estudados apresentou características promissoras, como uma resistência mecânica à compressão de 62 MPa, que é da mesma ordem apresentada por vários ossos humanos, tendo assim potencial como biomaterial para ser utilizado na fixação de fraturas¹⁴².

Membranas de PHAscl foram caracterizadas recentemente, tendo sido demonstrada a influência de sua alta cristalinidade tanto na morfologia como na sua permeabilidade. Membranas PHB mostraram alta seletividade para vapor de água, comparada a etanol e acetona. Já o copolímero PHB-co-HV não mostrou a mesma seletividade à água ou ao vapor de etanol¹⁴².

Empregando polimerização induzida por radiação, foram também sintetizadas e caracterizadas redes de polietilenoglicol diacrilato com PHB, visando a produção de materiais com possibilidades de aplicação médica, tendo se observado os efeitos da radiação na alteração parcial da região cristalina do polímero o que interfere também no processo de degradação¹⁴³. Em 2006, novas microesferas de PHB/PHPE foram produzidas e estudadas como um sistema liberador de droga para a terapia fotodinâmica de células neoplásicas^{144,145}.

TESTES DE BIODEGRADABILIDADE

As diversas modificações e formulações envolvendo PHA estudadas requerem comprovações constantes da manutenção de uma de suas características essenciais, que é a biodegradabilidade. Uma das formas de avaliação da biodegradabilidade consiste na medida quantitativa da conversão do carbono constituinte do PHA em gás carbônico por um conjunto de bactérias do ambiente^{146,147}. A capacidade de diversos microrganismos degradarem PHA e outros poliésteres pode envolver um ou mais mecanismos enzimáticos. Es-

tudos para isolar e caracterizar microrganismos degradadores de PHA, bem como poli-ε-caprolactona (PCL) e polilactatos (PLA) revelaram grupos microbianos capazes de degradar os diferentes materiais avaliados, o que pode ser relevante para testes rápidos preliminares que avaliem biodegradabilidade de novas formulações em desenvolvimento¹⁴⁷. Há indicativos também de que PHB e PCL quando moldados por compressão a quente se tornam mais susceptíveis ao ataque por fungos¹⁴⁸. A biodegradabilidade de PHB e PCL submetidos à compostagem a diferentes pH também foi avaliada após irradiação com UV-B. Apenas uma condição específica de irradiação e pH aumentou a biodegradação e em todos os casos o PHB apresentou maior perda de massa que PCL¹⁴⁹.

COMENTÁRIOS FINAIS E PERSPECTIVAS

Pode-se observar a evolução ocorrida no país no desenvolvimento de tecnologia e de conhecimento científico relativos à produção de poli-hidroxialcanoatos e sua utilização como polímero biodegradável e biocompatível. Uma análise deste conhecimento acumulado no país permite apontar, como alvo atual, o controle de diferentes aspectos da produção de PHA para assim, uma vez determinada uma propriedade necessária a uma dada aplicação, modular a sua composição monomérica, de modo a se produzirem polímeros sob medida para aplicações estratégicas, a partir do controle dos fluxos metabólicos do microrganismo produtor, do uso das estratégias de produção em biorreator, em um trabalho intrinsecamente multidisciplinar. As perspectivas para este desenvolvimento foram apresentadas em trabalho recente divulgado pelo Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE) do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio sobre polímeros e intermediários químicos, com o objetivo de fornecer subsídios para a política de biotecnologia industrial no Brasil. Em suas conclusões, o trabalho indica que nosso país tem posição mundial privilegiada, por dispor de matérias-primas renováveis a baixo custo (fontes de carbono e energia) e por, potencialmente, possuir mão-de-obra qualificada formada pelos diversos grupos de pesquisa já estabelecidos oferece oportunidades para o estabelecimento de uma plataforma mundial produtora e exportadora de biopolímeros, desde que ações concretas de financiamento e de organização das atividades de pesquisa e desenvolvimento sejam estabelecidas pelos órgãos públicos, em consonância com os setores produtivos do país¹³¹.

REFERÊNCIAS

- Anderson, A. J.; Dawes, E. A.; *Microbiol. Rev.* **1990**, *54*, 450.
- Holmes, P. A.; *Phys. Technol.* **1985**, *16*, 32.
- Gruber, P.; *Abstracts of 8th International Symposium on Biological Polyesters*, Massachussetts, USA, 2000.
- Fujimaki, T.; *Polym. Degrad. Stab.* **1998**, *59*, 209.
- <http://www.plastico.com.br/revista/pm340/resinas1.htm>, acessada em Agosto 2006
- Choi, J.; Lee, S. Y.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 13.
- Bueno Netto, C. L.; *Anais do IV Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa*, Maringá, Brasil, 1996.
- Gomez, J. G. C.; Bueno Netto, C. L.; *Revista Brasileira de Engenharia Química* **1997**, *17*, 24.
- Mothé, C. G.; Leite, S. G.; Martins, A. B.; *Plástico Moderno* **1997**, *272*, 20.
- Formolo, M. C.; Vogelsanger-Jr, N.; Schneider, A. L.; Furlan, S. A.; Aragão, G. M. F.; Pezzin, S. H.; Pezzin, A. P. T.; *Anais do 7^o Congresso Brasileiro de Polímeros*, Belo Horizonte, Brasil, 2003.
- Squilo, C. R.; Marangoni, C.; Vecchi, C. S.; Aragão, G. M. F.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 257.
- Gomez, J. G. C.; Rodrigues, M. F. A.; Alli, R. C. P.; Torres, B. B.; Bueno Netto, C. L.; Oliveira, M. S.; Silva L. F.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, *45*, 785.
- Piccoli, R. A. M.; Bueno Netto, C. L.; Pradella, J. G. C.; Taciro, M. K.; Pereira, R. P. M.; Urenha, L. C.; Simões, D. A.; *Anais do IV Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa*, Maringá, Brasil, 1996.
- Gomez, J. G. C.; Fontolan, V.; Alli, R. C. P.; Rodrigues, M. F. A.; Bueno Netto, C. L.; Silva, L. F.; Simões, D. A.; *Rev. Microbiol.* **1997**, *28*, 43.
- Taciro, M. K.; Pereira, R. P. M.; Pradella, J. G. C.; Bueno Netto, C. L.; Simões, D.; *Braz. J. Microbiol.* **1997**, *28*, 49.
- Piccoli, R. A. M.; Gomez, J. G. C.; Bonomi, A.; Ferraz, L.; Kapritchkoff, F. M.; Takano, C.; Mattos, M. N.; Oliveira, V.; Fontolan, V.; *Braz. J. Chem. Eng.* **1999**, *16*, 199.
- Ferraz, L.; Bonomi, A.; Piccoli, R. A. M.; Kapritchkoff, F. M.; Schmidell, W.; Alli, R. C. P.; Takano, C.; Mattos, M. N.; Oliveira, V.; Fontolan, V.; *Braz. J. Chem. Eng.* **1999**, *16*, 205.
- Bueno Netto, C. L.; Craveiro, A.; Pradella, J. G. C.; Oliveira, M. S.; Maiorano, A. E.; Gomes, P. A.; Matsubara R. M.; *Br PI 9103116-8*, **2000**.
- Franchetti, S. M. M.; Marconato, J. C.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 811.
- Silva, L. F.; Gomez, J. G. C.; Oliveira, M. S.; Torres, B. B.; *J. Biotechnol.* **2000**, *76*, 165.
- Tavares, L. Z.; Silva, E. S.; Pradella, J. G. C.; *Biochem. Eng. J.* **2004**, *18*, 21.
- Nonato, R. V.; Mantelato, P. E.; Rossell, C. E. V.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *57*, 1.
- Steinbüchel, A. Em *Polyhydroxyalkanoic acids*; Byrom, D. ed.; Macmillan Publishers: Basingstoke, 1991.
- Gomez, J. G. C.; Rodrigues, M. F. A.; Alli, R. C. P.; Silva, L. F.; Oliveira, M. S.; Bueno Netto, C. L.; *Anais do 2^o Congresso Brasileiro de Polímeros*, São Paulo, Brasil, 1993.
- Steinbüchel, A.; Valentin, H. E.; *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, *128*, 219.
- Brandl, H.; Gross, R. A.; Lenz, R. W.; *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **1990**, *41*, 77.
- Byrom, D. Em *Novel biodegradable microbial polymers*; Dawes, E. A., ed.; Kluwer: London, 1990.
- Ramsay, J. A.; Aly Hassan, M. C.; Ramsay, B. A.; *Can. J. Microbiol.* **1995**, *41*, 262.
- Rehm, B. H.; *Biochem. J.* **2003**, *15*, 15.
- Collins, S. H. Em *Carbon substrates in biotechnology*; Stowell, F. D., ed.; Society for General Microbiology: Washington, DC, 1987, nº 21, cap. 3.
- Rehm, B. H. R.; Steinbüchel, A.; *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *25*, 3.
- Gomez, J. G. C.; Bueno Netto, C. L. Em *Biotechnologia Industrial*; Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W., eds.; Edgard Blücher: São Paulo, 2001, cap. 10.
- Derenzo, S.; Saito, R. M.; Garófalo, G. M. C.; Ribeiro, A. M. M.; Bueno Netto, C. L.; Mantelato, P. E.; Rossel, C. E. V.; *Br PI 9302312-0*, **2002**.
- Gomez, J. G. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 1994.
- Piccoli, R. A. M.; Bueno Netto, C. L.; Taciro, M. K.; Urenha, L. C.; Pradella, J. G. C.; Pereira, R. P. M.; Simões, D. A.; *Anais do IV Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa*, Maringá, Brasil, 1994.
- Piccoli, R. A. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 1995.
- Pinto, R. O.; Becker, D.; Furigo Jr, A.; Aragão, G. M. F.; *Anais do XIII Simpósio Nacional de Fermentações*, Teresópolis, Brasil, 2000.
- Sim, S. J.; Snell, K. D.; Hogan, S. A.; *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 63.
- Silva, E. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2000.
- Marangoni, C.; Furigo Jr, A.; Aragão, G. M. F.; *Braz. J. Chem. Eng.* **2001**, *18*, 175.
- Gomez, J. G. C.; Fontolan, V.; Alli, R. C. P.; Rodrigues, M. F. A.; Bueno Netto, C. L.; Silva, L. F.; Simões, D. A.; *Anais do XI Simpósio Nacional de Fermentações*, São Carlos, Brasil, 1996.
- Gomez, J. G. C.; Silva, L. F.; Rodrigues, M. F. A.; Bueno Netto, C. L.; Simões, D. A.; Torres, B. B.; *Anais do XI Simpósio Nacional de Fermentações*, São Carlos, Brasil, 1996.
- Brämer, C.; Vandamme, P.; Silva, L. F.; Gomez, J. G. C.; Steinbüchel, A.; *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2001**, *51*, 1709.
- Michelin-Ramos, M. E.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2003.
- Silva, L. F.; Taciro, M. K.; Ramos, M. E. M.; Carter, J. M.; Pradella, J. G. C.; Gomez, J. G. C.; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *31*, 245; Silva, L. F.; Gomez, J. G. C.; Taciro, M. K.; Ramos, M. E. M.; Carter, J. M.; Pradella, J. G. C.; *Br PI 0207356-0*, **2002**.
- Buffoni, E.; Gomez, J. G. C.; Silva, L. F.; *Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Recife, Brasil, 2005.
- Nogueira, N. R.; Gomes, R. S.; Gomez, J. G. C.; Silva, L. F.; *Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Recife, Brasil, 2005.
- Lima, T. C. S.; Grisi, B. M.; Bonato, M. M.; *Rev. Microbiol.* **1999**, *30*, 214.
- Oliveira, R. C.; Gomez, J. G. C.; Torres, B. B.; Bueno Netto, C. L.; Silva, L. F.; *Rev. Microbiol.* **2000**, *31*, 87.

50. Bonatto, D.; Matias, F.; Lisbôa, M. P.; Bogdawa, H. M.; Henriques, J. A. P.; *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *20*, 395.
51. Matias, F.; Padilla, G.; Rodrigues, M. F. A.; *Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Recife, Brasil, 2005.
52. Delgado, C. C. R.; Pradella, J. G. C.; *Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Recife, Brasil, 2005.
53. Fonseca, G. G.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2003.
54. Fonseca, G. F.; Antonio, R. V.; *Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações*, Florianópolis, Brasil, 2003.
55. Arruda, J. C.; Antonio, R. V.; *Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações*, Florianópolis, Brasil, 2003.
56. Fava, A. L. B.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 1997.
57. Vicente, E. J.; Schenberg, A. C. G.; Fava, A. B.; *BR PI 9806581-5*, **1998**.
58. Friehs, K.; Lafferty, R. M.; *J. Biotechnol.* **1989**, *10*, 285.
59. Filipov, M. C. O.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2000.
60. Doi, Y.; Kawaguchi, Y.; Koyama, N.; *FEMS Microbiol. Lett.* **1992**, *103*, 103.
61. Tezza, T. D.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2001.
62. Gambetta, G.; Finkler, L.; Pinto, J. C.; *Anais do XIV Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Florianópolis, Brasil, 2003.
63. Piemolini, L. T.; Vasconcellos, R. V.; Porto, L. M.; *Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações*, Florianópolis, Brasil, 2003.
64. Piemolini, L. T.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.
65. Pedrini, M. R. S.; Souza, J. A. R.; Aragão, G. M. F.; Furigo Jr, A.; *Anais do VI Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas*, Maringá, Brasil, 1999.
66. Tavares, L. Z.; Pradella, J. G. C.; *Anais do VI Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas*, Maringá, Brasil, 1999.
67. Tavares, L. Z.; Silva, E. S.; Pradella, J. G. C.; Bonomi, A.; *Anais do XIII Simpósio Nacional de Fermentações*, Teresópolis, Brasil, 2000.
68. Tavares, L. Z.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2000.
69. Tavares, L. Z.; Pradella, J. G. C.; *Anais do XIII Simpósio Nacional de Fermentações*, Teresópolis, Brasil, 2000.
70. Pataquiva, A. Y.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2003.
71. Oliveira, F. C.; Freire, D. M. G.; Dias, L. M.; Castilho, L. R.; *Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações*, Florianópolis, Brasil, 2003.
72. Oliveira, F. C.; Freire, D. M. G.; Castilho, L. R.; *Biotechnol. Lett.* **2004**, *26*, 1851.
73. Oliveira, F. C.; Freire, D. M. G.; Castilho, L. R.; *Br PI 0400116-8* (Pedido de patente), **2004**.
74. Doi, Y.; Tamaki, A.; Kunioka, M.; *Makromol. Chem. Rapid Commun.* **1987**, *8*, 631.
75. Rodrigues, M. F. A.; Silva, L. F.; Gomez, J. G. C.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, *43*, 880.
76. Silva, L. F.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 1998.
77. Sartori, D. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil.
78. Gomez, J. G. C.; Silva, L. F.; *BR PI 9806557*, **1998**.
79. <http://www.comciencia.br/reportagens/biodiversidade/bio15.htm>, acessada em Agosto 2006.
80. Michelin-Ramos, M. E.; Gomez, J. G. C.; Oliveira, M. S.; Torres, B. B.; Silva, L. F.; *Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações*, Florianópolis, Brasil, 2003.
81. Brämer, C. O.; Silva, L. F.; Gomez, J. G. C.; Priefert, H.; Steinbüchel, A.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 271.
82. Brämer, C. O.; Steinbüchel, A.; *Microbiology* **2001**, *147*, 2203.
83. Pereira, E. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2003.
84. Pereira, E. M.; Gomez, J. G. C.; Silva, L. F.; *Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Recife, Brasil, 2005.
85. Aragão, G. M. F.; Lindley, N. D.; Uribellarea, J. L.; Pareilleux, A.; *Biotechnol. Lett.* **1996**, *18*, 937.
86. Taciro, M. K.; Pereira, R. P. M.; Pradella, J. G. C.; Bueno Netto, C. L.; Simões, D. A.; *Anais do XI Simpósio Nacional de Fermentações*, São Carlos, Brasil, 1996.
87. Pereira, R. P. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 1996.
88. Takano, C. Y.; Ferraz, L.; Piccoli, R. A. M.; Kapritchkoff, F. M.; Bonomi, A.; *Anais do II Congresso Brasileiro de Engenharia Química e Iniciação Científica*, Uberlândia, Brasil, 1996.
89. Bonomi, A.; Piccoli, R. A. M.; Ferraz, L.; Kapritchkoff, F. M.; Alli, R. C. P.; Mattos, M. N.; Oliveira, V.; Takano, C. Y.; Fontolan, V.; *Anais do V Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas*, Maringá, Brasil, 1996.
90. Ferraz, L. P. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 1999.
91. Ferraz, L.; Bonomi, A.; Piccoli, R. A. M.; Kapritchkoff, F. M.; Schmidell, W.; Alli, R. C. P.; Takano, C.; Mattos, M. N.; Oliveira, V.; Fontolan, V.; *Anais do XII Simpósio Nacional de Fermentações*, Uberlândia, Brasil, 1998.
92. Piccoli, R. A. M.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2000.
93. Piccoli, R. A. M.; Quiroz, L. H. C.; Fleury, A.; Mattos, M. N.; Oliveira, V.; Bonomi, A.; *Anais do XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química e XIX Interamerican Congress of Chemical Engineering*, Águas de São Pedro, Brasil, 2000.
94. Pereiralima, P. S.; Tannuri, E. A.; Piccoli, R. A. M.; Quiroz, L. H. C.; Bonomi, A.; Fleury, A. T.; Ferraz, L.; *Anais do XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, Porto Alegre, Brasil, 1998.
95. Salomão, M. Z.; Taciro, M. K.; Pereira, R. P. M.; Pradella, J. G. C.; Simões, D. A.; Bueno Netto, C. L.; *Anais do XI Simpósio Nacional de Fermentações*, São Carlos, Brasil, 1996.
96. Marangoni, C.; Furigo Jr., A.; Aragão, G. M. F.; *Anais do XIII Simpósio Nacional de Fermentações*, Teresópolis, Brasil, 2000.
97. Marangoni, C.; Finkler, L.; Aragão, G. M. F.; *Anais do XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, Natal, Brasil, 2002.
98. Rodrigues, R. C.; Fiorese, M. L.; Arnosti, E. P.; Ramos, R. A. W.; Pezzin, A. P. T.; Aragão, G. M. F.; *Revista Matéria* **2004**, *9*, 378.
99. Rocha, R. C. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2002; Rocha, R. C. S.; Pereira, F. S.; Taciro, M. K.; Rodrigues, M. F. A.; Pradella, J. G. C.; *Quím. Nova*, **2007**, *30*, 53.
100. Miyahira, T.; Silva, E. S.; Pradella, J. G. C.; *Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Recife, Brasil, 2005.
101. Valentim, H. E.; Berger, P. A.; Gruys, K. J.; Rodrigues, M. F. A.; Steinbüchel, A.; Tran, M.; Asrar, J.; *Macromolecules* **1999**, *32*, 7389.
102. Rodrigues, M. F. A.; Silva, L. F.; Gomez, J. G. C.; Valentim, H. E.; Steinbüchel, A.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, *43*, 880.
103. Rodrigues, M. F. A.; Oliveira, M. C.; Gomez, J. G. C.; Alli, R. C. P.; Bueno Netto, C. L.; Silva, L. F.; Torres, B. B.; *Anais do VI Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas*, Maringá, Brasil, 1996.
104. Rodrigues, M. F. A.; Steinbüchel, A.; Vicente, E. J.; *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *193*, 179.
105. Rodrigues, M. F. A.; Valentim, H.; Berger, P. A.; Tran, M.; Asrar, J.; Gruys, K. J.; Steinbüchel, A.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *53*, 453.
106. Salomoni, R.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2005.
107. Pereira, F. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2003.
108. Brandl, H.; Gross, R. A.; Lenz, R. W.; Fuller, R. C.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *54*, 1977.
109. Haywood, G. W.; Anderson, A. J.; Ewing, D. F.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, *56*, 3354.
110. Gomez, J. G. C.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2000.
111. Silva, L. M. B.; Gomez, J. G. C.; Oliveira, M. S.; Taciro, M. K.; Pradella, J. G. C.; Silva, L. F.; Torres, B. B.; *Anais do XII Simpósio Nacional de Fermentações*, Uberlândia, Brasil, 1998.
112. Silva, S. R.; Gomez, J. G. C.; Costa, M.; Taciro, M. K.; Santos, A. L.; Pradella, J. G. C.; *Anais do VI Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas*, Maringá, Brasil, 1999.
113. Strellec, T.; Sato, F. H.; Silva, L. F.; Gomez, J. G. C.; *Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Recife, Brasil, 2005.
114. Sánchez, R. J.; Schripsema, J.; Silva, L. F.; Taciro, M. K.; Pradella, J. G. C.; Gomez, J. G. C.; *Eur. Polym. J.* **2003**, *39*, 1385.
115. Diniz, S. C.; Taciro, M. K.; Gomez, J. G. C.; Pradella, J. G. C.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2004**, *119*, 51; Diniz, S. C.; Gomez, J. G. C.; Silva, L. F.; Costa, M.; Taciro, M. K.; Silva, S. R.; Pradella, J. G. C.; *Anais do VI Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas*, Maringá, Brasil, 1999.
116. Taciro, M. K.; Gomez, J. G. C.; Silva, L. F.; Pradella, J. G. C.; *Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Recife, Brasil, 2005.
117. Gómez, J. G. C.; Silva, L. F.; Pradella, J. G. C.; Taciro, M. K.; Silva-Queiroz, S. R.; Bretãs, A. F.; Rangel, F. A.; Sanches, R.; *Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Recife, Brasil, 2005.
118. Ashby, R. D.; Foglia, T. A.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *49*, 431.
119. Silva, S. R.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2003.
120. Antonio, R. V.; Steinbüchel, A.; Rehm, B. H. A.; *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *182*, 111.
121. Rehm, B. H. A.; Antonio, R. V.; Spiekermann, P.; Amara, A. A.; Steinbüchel, A.; *Biochim. Biophys. Acta Enzimol.* **2002**, *1594*, 178.
122. Lee, S. Y.; Choi, J.; *Polym. Degrad. Stab.* **1998**, *59*, 387.

123. Mantelatto, P. E.; Duzzi, A. M.; Sato, T.; Durão, N. A. S.; Rocchiccioli, C.; Kesslerlingh, S. M.; *US pat. 052175* **2005**.
124. Noda, I.; *Br PI 9507830-4, PCT US9506651*, **1995**.
125. Bernhard, A. H. O., Zuccolo, M.; Gonçalves, I. M.; Ogaki, Y.; Coimbra, J. S. R.; Bueno Netto, C. L.; *Anais do V Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa*, Maringá, Brasil, 1996.
126. Steinbüchel, A. Em *Biotechnology*; Rehm, H. J.; Reed, G.; Roehr, M., eds.; Wiley: New York, 1996, cap. 2.
127. Zuccolo, M.; Ribeiro, A. M. M.; Ogaki, Y.; Alli, R. C. P.; Bueno Netto, C. L.; *Anais do V Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas*, Maringá, Brasil, 1996.
128. Zuccolo, M.; Carter, J. M.; Morita D. M.; Gonçalves, I. M.; Coimbra, J. S. R.; Bueno Netto, C.L.; *Anais do V Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas*, Maringá, Brasil, 1996.
129. Kapritchkoff, F. M.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2002.
130. Kapritchkoff, F. M.; Viotti, A. P.; Alli, R. C. P.; Zuccolo, M.; Pradella, J. G. C.; Maiorano, A. E.; Miranda, E. A.; Bonomi, A.; *J. Biotechnol.* **2006**, *122*, 453.
131. http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr06_biopolimeros.pdf, acessada em Agosto 2006.
132. Quental, A. C.; Felisberti, M. I.; *Anais do 6º Congresso Brasileiro de Polímeros*, Gramado, Brasil, 2001.
133. Pachekoski, W. M.; Rosário, F.; Ezquerria, T. A.; Agnelli, J. A. M.; *Anais do 7º Congresso Brasileiro de Polímeros*, Belo Horizonte, Brasil, 2003.
134. Caraschi, J. C.; Leão, A. L.; *Anais do 6º Congresso Brasileiro de Polímeros*, Gramado, Brasil, 2001.
135. Caraschi, J. C.; Leão, A. L.; *Anais do 5º Congresso Brasileiro de Polímeros*, Águas de Lindóia, Brasil, 1999.
136. Innocentini-Mei, L. H.; Bartoli, J. R.; Baltieri, R. C.; *Macromol. Symp.* **2003**, *197*, 77.
137. Antunes, M. C. M.; Felisberti, M. I.; *Anais do 7º Congresso Brasileiro de Polímeros*, Belo Horizonte, Brasil, 2003.
138. Baltieri, R. C.; Innocentini-Mei, L. H.; Bartoli, J.; *Macromol. Symp.* **2003**, *197*, 33.
139. Eligio, T.; Rieumont, J.; Sánchez, R.; Silva, J. F. S.; *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* **1999**, *270*, 69.
140. Maia, J. L.; Santana, M. H. A.; Ré, M. I.; *Braz. J. Chem. Eng.* **2004**, *21*, 1.
141. Sá, J. S. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Brasil, 2000.
142. Galego, N.; Miguens, F. C.; Sánchez, R.; *Polymer* **2002**, *43*, 3109.
143. Martellini, F.; Innocentini-Mei, L. H.; Silvano, L.; Carezza, M.; *Radiat. Phys. Chem.* **2004**, *71*, 257.
144. Ré, M. I.; Rodrigues, M. F. A.; Silva, E. S.; Castro, I. M.; Simioni, A. R.; Pelisson, M. M. M.; Beltrame, M.; Tedesco, A. C.; *Minerva Biotecnologica* **2006**, *18*, 3.
145. Ré, M. I.; *Drying Technology* **2006**, *24*, 433.
146. Sturm, R.; *J. Oil Chem. Soc.* **1973**, *50*, 159.
147. Santos, J. P.; Wada, M. S.; Gomez, J. G. C.; Silva, L. F.; *Anais do 7º Congresso Brasileiro de Polímeros*, Belo Horizonte, Brasil, 2003.
148. Rosa, D. S.; Pentead, D. F.; Calil, M. R.; *Anais do 5º Congresso Brasileiro de Polímeros*, Águas de Lindóia, Brasil, 1999.
149. Santos, C. E. O.; Rodrigues, T. C.; Rosa, D. S.; Calil, M. R.; *Anais do 6º Congresso Brasileiro de Polímeros*, Gramado, Brasil, 2001.