



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

DIEGO AIRES DA SILVA

**PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS DE CADEIA MÉDIA
POR *Pseudomonas oleovorans* UTILIZANDO EXTRATO DE
MANDIOCABA COMO FONTE DE CARBONO**

BELÉM

2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

DIEGO AIRES DA SILVA

**PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS DE CADEIA MÉDIA
POR *Pseudomonas oleovorans* UTILIZANDO EXTRATO DE
MANDIOCABA COMO FONTE DE CARBONO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Rosinelson da Silva Pena

Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Regina Vasconcellos
Antonio (UFSC)

BELÉM

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Silva, Diego Aires da

Produção de polihidroxialcanoatos de cadeia média por *pseudomonas oleovorans* utilizando extrato de mandioca como fonte de carbono /Diego Aires da Silva; orientador, Rosinelson da Silva Pena; coorientador, Regina Vasconcellos Antonio._ Belém - 2012

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Instituto de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2012

1.Biotecnologia 2. Biopolímeros 3. Mandioca I. Título

CDD 22.ed. 660.6



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

DIEGO AIRES DA SILVA

**PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS DE CADEIA MÉDIA
POR *Pseudomonas oleovorans* UTILIZANDO EXTRATO DE
MANDIOCABA COMO FONTE DE CARBONO**

BELÉM

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DIEGO AIRES DA SILVA

**PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS DE CADEIA MÉDIA
POR *Pseudomonas oleovorans* UTILIZANDO EXTRATO DE
MANDIOCABA COMO FONTE DE CARBONO**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Rosinelson da Silva Pena
(FEA/ITEC/UFPA – Orientador)

Prof^a. Dr^a. Regina Vasconcellos Antonio
(CCB/BQA/UFSC – Co-Orientador)

Prof. Dr. Márcio José Rossi
(CCB/MIP/UFSC – Membro)

Prof^a. Dr^a. Vanessa Albres Botelho da Cunha
(FEA/ITEC/UFPA – Membro)

Prof. Dr. Hamilton Mendes de Figueiredo
(FEA/ITEC/UFPA – Membro)

Aos meus pais Marilene e Hélio, aos meus irmãos
Mariane e Fábio, pelo apoio incondicional que me
deram em todos os momentos da minha vida,
inclusive em mais esta etapa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua constante presença em minha vida.

Ao meu orientador Rosinelson da Silva Pena pela confiança depositada em mim no início deste trabalho, pelo acompanhamento eficiente, pela disponibilidade, e boa vontade em buscar os recursos financeiros quando necessário e claro, pela amizade.

À professora Regina Vasconcellos Antonio pelo apoio e acolhida em Florianópolis, pela ótima orientação e aconselhamentos que foram determinantes na conclusão deste trabalho e pela amizade construída no período em que estive em seu laboratório.

Ao Professor Márcio José Rossi por disponibilizar seu laboratório e equipamentos (Biorreator), por depositar confiança em mim quando precisei virar a noite em seu laboratório fazendo experimentos e por dispor seu tempo tão corrido para tirar minhas dúvidas quanto ao andamento das fermentações.

Aos meus pais, meus exemplos de honestidade, dedicação e respeito, e aos meus irmãos pela força que me deram.

À minha namorada Giselle pela paciência, que um namoro a distância exige, pelo carinho e respeito, pela força nos momentos de dificuldade.

Aos meus antigos e queridos amigos, Stephano, Valena, Rafaelle, Vitt, Bia, Jonnahta, que, mesmo distantes, fizeram-se presentes tantas vezes e torceram sempre por mim.

Aos meus novos amigos, Karina, Raquel, Léo, Renata, Jeniffer, Maria Luiza, por terem me recebido tão bem na cidade, por serem tão prestativos e acessíveis me ajudando na familiarização dos procedimentos e pelos momentos de descontração que também foram imprescindíveis.

A pessoas como, professor José Gregório Cabrera Gomez (IPT/USP) por ceder os padrões de PHA_{MCL} sem os quais não teria concluído os experimentos. Ao professor Willibaldo Schmidell (UFSC) por se mostrar bastante acessível, quando solicitei seus valiosos conhecimentos sobre as cinéticas de fermentação. Ao Renato, pela ajuda e paciência, que o cromatógrafo às vezes nos exigia, à Prof^a. Vanessa e Prof. Hamilton pelas importantes sugestões que deram ao trabalho.

Ao PPGCTA em nome da professora Luiza Helena Meller da Silva pelo suporte, fundamental à realização deste trabalho.

À EMBRAPA Amazônia Oriental, principalmente a Dra. Rafaella Matietto e Dr. Roberto Lisboa Cunha por ceder os laboratórios e equipamentos.

Ao CNPq, e a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Muito Obrigado.

RESUMO

Polihidroxialcanoatos (PHAs) formam uma classe de poliésteres naturais, que podem ser acumulados por diversos microrganismos sob a forma de grânulos intracelulares e podem representar até 80 % do peso seco das células. A função mais frequentemente atribuída a estes grânulos é a reserva de carbono, energia e equivalentes redutores. Têm a vantagem de serem materiais biodegradáveis e por isso, são bons candidatos para substituírem os plásticos de origem petroquímica. São produzidos por bactérias pertencentes aos mais diversos grupos taxonômicos que podem utilizar as mais variadas fontes de carbono como, ácidos graxos derivados de fontes vegetais, efluentes industriais ou resíduos da indústria de alimentos que são ótimas fontes de carboidratos, entre outros. Neste trabalho, estudou-se a produção de PHAs por *Pseudomonas oleovorans* ATCC29347, utilizando como fontes de carbono extrato de mandioca, uma raiz nativa da região amazônica que contém alta concentração de açúcares livres, como glicose, frutose e sacarose ($\approx 40 \text{ g L}^{-1}$), adicionada de óleo de andiroba, uma oleaginosa também nativa da Amazônia, em frascos agitados e em biorreator do tipo *Airlift*. Nos ensaios em frascos agitados, a produção de PHA, em base seca, foi de 9,50% com glicose; 3,77% com sacarose; 5,84% com frutose; 2,50% com extrato de mandioca e 9,0% com óleo de andiroba. A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) foi de: 0,16, 0,14; 0,05; 0,15 e $0,1 \text{ h}^{-1}$ e fator de conversão de substrato em célula ($Y_{x/s}$) de: 0,22, 0,28, 0,25 e $0,52 \text{ g}_x \text{ g}_s^{-1}$ para os substratos: glicose, sacarose, frutose, extrato de mandioca e óleo de andiroba, respectivamente. Não foi possível encontrar $Y_{x/s}$ para o óleo de andiroba. Foram realizados quatro cultivos em biorreatores *Airlift*, obtendo-se uma produção de PHA, em base seca, de 6,24; 5,87; 15,96 e 18,41%; $\mu_{\max}$ de 0,23; 0,36; 0,23 e $0,27 \text{ h}^{-1}$; fator de conversão de substrato em célula ($Y_{x/s}$) de 0,19; 0,26; 0,17 e $0,23 \text{ g}_x \text{ g}_s^{-1}$; e fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) de 0,034; 0,008; 0,034 e $0,027 \text{ g}_p \text{ g}_s^{-1}$, nos cultivos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Nos cultivos, em frascos agitados, bem como no biorreator, foram majoritariamente produzidos unidades de 3-hidroxi-decanoato (3HD) e 3-hidroxi-dodecanoato (3HDD), e em menor proporção, os monômeros 3-hidroxi-butirato (3HB), 3-hidroxi-hexanoato (3HHx) e 3-hidroxi-octanoato (3HO). Polímeros do tipo produzido podem ter aplicações bastante específicas e sua produção não é usual. O extrato de mandioca se mostrou um substrato em potencial para a produção de PHA. *P. oleovorans* mostrou acumular PHA sob limitação de nitrogênio, mas também de oxigênio nas condições estudadas.

Palavras-chave: Mandioca, PHA_{MCL}, Cultivo submerso.

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are a class of natural polyesters, which can be accumulated by many microorganisms in the form of intracellular granules and can represent up to 80 % dry weight of cells. The function most often attributed to these beads is the stock of carbon, energy and reducing equivalents. They have the advantage of being biodegradable materials and are therefore good candidates to replace the plastics of petrochemical origin. They are produced by bacteria belonging to diverse taxonomic groups that may use the various carbon sources such as fatty acids derived from plant sources, industrial effluents and wastes from the foods that are good sources of carbohydrates, among others. In this work, we studied the production of PHAs by *Pseudomonas oleovorans* ATCC29347, using as carbon sources mandiocaba extract, a root native to the Amazon region that contains a high concentration of free sugars such as glucose, fructose and sucrose ($\approx 40 \text{ g L}^{-1}$) added Andiroba oil, an oil also native to the Amazon in shaken flasks and airlift bioreactor type. In tests in shaken flasks, the production of PHA, on a dry basis, was 9.50% with glucose, 3.77% with sucrose, 5.84% with fructose, 2.50% with mandiocaba extract and 9.00 % with Andiroba oil. The maximum specific growth rate ($\mu_{\max}$) was: 0.16, 0.14, 0.05, 0.15 and 0.1 h^{-1} and conversion factor of cell substrate ($Y_{x/s}$): 0.22, 0.28, 0.25 and $0.52 \text{ g}_x \text{ g}_s^{-1}$ for the substrates glucose, sucrose, fructose, and extract mandiocaba Andiroba oil, respectively, could not find $Y_{x/s}$ for the Andiroba oil . Were conducted four crops in biorreatos *Airlift*, resulting in a production of PHA, on a dry basis, of 6.24, 5.87, 15.96 and 18.41%; $\mu_{\max}$ of 0.23, 0.36, 0.23 and 0.27 h^{-1} ; conversion factor of cell substrate ($Y_{x/s}$) 0.19, 0.26, 0.17 and $0.23 \text{ g}_x \text{ g}_s^{-1}$, and conversion factor of substrate to product ($Y_{p/s}$) of 0.034, 0.008, 0.034 and $0.027 \text{ g}_p \text{ g}_s^{-1}$ in cultures 1, 2, 3 and 4, respectively. In cultured in shaken flasks, as well as the bioreactor, mainly produced units of 3-hydroxy-decanoate (3HD) and 3-hydroxy-dodecanoate (3HDD), and to a lesser extent, the monomers 3 hydroxy-butyrate (3HB) 3-hydroxy-hexanoate (3HHx) and 3-hydroxy-octanoate (3HO). Polymers of the type produced may have very specific applications and their production is not unusual. Mandiocaba extract showed a potential substrate for the production of PHA. *P. oleovorans* accumulated PHA showed under nitrogen limitation, but also oxygen under the conditions studied.

Keywords: Sugary cassava, PHA_{MCL}, fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação geral dos Polihidroxicanoatos (PHAs).....	20
Figura 2. Esquema geral da síntese de PHA. Os três fatores chave que determinam a composição monomérica do PHA estão destacados dentro de retângulos.....	30
Figura 3. Rotas metabólicas para a biossíntese de PHA _{MCL} . Fonte: (STEINBÜCHEL, 2010).....	31
Figura 4. Fluxograma de obtenção do extrato de mandioca (Manipueira).....	35
Figura 5. (A) Extrato da mandioca (parte utilizada nos experimentos) e (B) massa fibrosa, resíduos da filtração.....	36
Figura 6. Inóculo de <i>Pseudomonas oleovorans</i> a partir de extrato de mandioca suplementado com fosfatos e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.....	39
Figura 7. Biorreator <i>airlift</i> utilizado nos experimentos.....	41
Figura 8. Concentração de biomassa (■), de açúcar redutor residual (○) e de nitrogênio residual (*), nos cultivos utilizando glicose, sacarose, frutose e extrato de mandioca como fonte de carbono, ao longo do tempo de cultivo de <i>P. oleovorans</i> , em frascos agitados. X = crescimento celular.	46
Figura 9. Evolução do pH durante o cultivo em frascos agitados. Glicose (■), Frutose (▲), Sacarose (○), Extrato de mandioca (●).	48
Figura 10. Cultivo de <i>P. oleovorans</i> em frasco agitado utilizando óleo de andiroba como fonte de carbono: (■) biomassa (X) (g L ⁻¹), (*) nitrogênio (g L ⁻¹), (□) pH, (●) PHA (g L ⁻¹).....	49
Figura 11. (A) Cultivo 1: extrato de mandioca sem diluição com concentração de açúcares totais de ≈40 g L ⁻¹ ; (B) porcentagem de oxigênio dissolvido. (■) Concentração de biomassa; (*) Nitrogênio residual; (○) Glicose residual; (●) PHA.	52
Figura 12. (A) Cultivo 2: extrato de mandioca diluído com água destilada para concentração de açúcares de ≈18 g L ⁻¹ ; (B) porcentagem de oxigênio dissolvido. (■) Concentração de biomassa; (*) Nitrogênio residual; (○) Glicose residual; (●) PHA.	53
Figura 13. (A) Cultivo 3: extrato de mandioca diluído com água destilada para concentração de açúcares de ≈18 g L ⁻¹ , adicionado de óleo de andiroba (1% v/v) e de (NH ₄) ₂ HPO ₄ a 0,2 g L ⁻¹ em 6,5 horas de cultivo; (B) porcentagem de oxigênio dissolvido. (■) Concentração de biomassa; (*) Nitrogênio residual; (○) Glicose residual; (●) PHA.	55
Figura 14. (A) Cultivo 4: extrato de mandioca diluído com água destilada para concentração de ≈13 g L ⁻¹ , adicionado de óleo de andiroba (1 % v/v) e (NH ₄) ₂ HPO ₄ a	

2,4 g L⁻¹, no início do cultivo; (B) porcentagem de oxigênio dissolvido. (■)

Concentração de biomassa; (*) Nitrogênio residual; (○) Glicose residual; (●) PHA.56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teor de glicose e sacarose de três acessos de mandiocaba e uma de mandioca.	18
Tabela 2. Propriedades de alguns biopolímeros e copolímeros.	23
Tabela 3. Principais características dos polímeros de cadeia média e polipropileno.	23
Tabela 4. Síntese das principais cepas de bactérias utilizadas na produção de PHAs.	26
Tabela 5. Síntese dos resultados da pesquisa realizada por Costa (2010), para produção de PHAs, utilizando manipueira e óleo usado de soja, como fontes de carbono, e linhagens de <i>Pseudomonas sp.</i> Resultados após 120 h de incubação.	29
Tabela 6. Composição do meio Luria Bertani (LB) utilizado.	33
Tabela 7. Composição do meio mineral utilizado, sem limitação.	34
Tabela 8. Composição do meio mineral utilizado, com limitação de Nitrogênio.	34
Tabela 9. Massas obtidas no processo de extração do extrato de mandiocaba.	44
Tabela 10. Composição físico-química do extrato de Mandiocaba.	44
Tabela 11. Composição em glicose, frutose e sacarose do extrato de mandiocaba.	45
Tabela 12. Perfil de ácidos graxos do óleo de andiroba utilizado e comercial.	45
Tabela 13. Produção de PHA em cultivo de <i>P. oleovorans</i> , em frascos agitados, utilizando glicose, sacarose, frutose, extrato de mandiocaba (MFS) e óleo de andiroba como fontes de carbono.	50
Tabela 14. Parâmetros cinéticos e grandezas de transformação para cultivos de <i>P. oleovorans</i> , em frascos agitados.	51
Tabela 15. Parâmetros cinéticos e grandezas de transformação dos cultivos de <i>Pseudomonas oleovorans</i> , em biorreator <i>airlift</i>	57
Tabela 16. Produção de PHA _{MCL} com <i>P. oleovorans</i> , utilizando extrato de mandiocaba suplementada com fosfatos e sulfato (MFS), em biorreator <i>airlift</i> , em 24 horas de cultivo.	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 A MANDIOCABA.....	18
3.2 POLIHIDROXIALCANOATOS	19
3.2.1 Histórico	21
3.2.2 Propriedades	21
3.2.3 Aplicações dos PHAs	23
3.2.4 Microrganismos produtores e substratos utilizados	25
3.2.4.1 <i>Pseudomonas</i>	27
3.2.4.2 Utilização de substratos de baixo custo na produção de PHAs	28
3.2.5 Biossíntese	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 MANDIOCABA.....	33
4.2 ÓLEO DE ANDIROBA	33
4.3 MICRORGANISMO UTILIZADO	33
4.4 MEIOS DE CULTURA	33
4.4.1 Meio Luria Bertani (LB).....	33
4.4.2 Meio mineral	34
4.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE MANDIOCABA	35
4.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EXTRATO DE MANDIOCABA.....	36
4.6.1 Determinação de glicose, frutose e sacarose.....	36
4.6.2 Determinação de umidade, cinzas e proteínas	36
4.7 PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE ANDIROBA.....	37
4.8 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PHA POR <i>P. OLEOVORANS</i> CULTIVADA EM FRASCOS AGITADOS	37
4.8.1 Estudo com <i>P. oleovorans</i> utilizando glicose, frutose, sacarose e óleo de andiroba como únicas fontes de carbono	37
4.8.2 Estudo com <i>P. oleovorans</i> utilizando o extrato de mandioca como única fonte de carbono	38
4.9 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PHA EM BIORREATOR DO TIPO AIRLIFT	38

4.9.1 Preparo do inóculo e do meio de cultura para o cultivo em biorreator	39
4.9.2 Equipamento e condições de operação do biorreator	40
4.10 MÉTODOS ANALÍTICOS	41
4.10.1 Determinação do pH.....	41
4.10.2 Determinação da biomassa	41
4.10.3 Quantificação e composição do PHA	42
4.10.4 Determinação dos substratos residuais.....	42
4.10.5 Determinação do nitrogênio residual.....	43
4.10.6 Cálculo dos parâmetros cinéticos.....	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE MANDIOCABA	44
5.2 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE MANDIOCABA	44
5.3 AVALIAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE ANDIROBA	45
5.4 EXPERIMENTOS EM FRASCOS AGITADOS	46
5.4.1 Estudo preliminar da fermentação de <i>P. oleovorans</i> no extrato de mandioca e seus açúcares constituintes.....	46
5.4.2 Comportamento de <i>P. oleovorans</i> com óleo de andiroba como fonte de carbono ...	48
5.4.3 Composição dos polímeros produzidos	50
5.5 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE PHA EM BIORREATOR AIRLIFT	52
6 CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS	60

NOMENCLATURAS

Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ATP	Adenosina trifosfato
DNS	Ácido 3-5 dinitrosalicílico
Da	Daltons
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
F6P	Frutose-6-fosfato
FID	Detector de ionização de chama
GPA	Gigapascal
(G6P)	Glicose-6-fosfato
(G6PDH)	Glicose-6-fosfato desidrogenase
J/m	Resistência ao impacto
LB	Meio Luria-Bertani
MM	Massa molecular
MPA	Megapascal
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
P(3HB)	Poli(3-hidroxibutirato)
P	Concentração de produto (g L^{-1})
PPi	Fosfato
P(3HB-co-3HV)	Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)
P(3HHx)	Poli(3-hidroxihexanoato)
P(3HO)	Poli(3-hidroxi octanoato)
P(3HD)	Poli(3-hidroxidecanoato)
P(3HDD)	Poli(3-hidroxdodecanoato)
PHA	Polihidroxialcanoato
PHA_{LCL}	Polihidroxialcanoato de cadeia lateral longa
PHA_{MCL}	Polihidroxialcanoato de cadeia lateral média
PHA_{SCL}	Polihidroxialcanoato de cadeia lateral curta
PHB	Polihidroxibutirato
PHBV	Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)
PGI	Ácido ribonucleico
RNA	Ácido Desoxirribonucleico
S	Concentração de substrato residual (g L^{-1})
STRs	Reatores de tanque agitado
Tg	Temperatura de transição vítrea
Tm	Temperatura de fusão
UHMW	Peso molecular ultra-alto
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto
$Y_{x/s}$	Fator de conversão de substrato em biomassa ($\text{g}_x \cdot \text{g}_s^{-1}$)
$Y_{x/p}$	Fator de conversão de substrato em produto ($\text{g}_x \cdot \text{g}_p^{-1}$)
$\mu_{\text{máx}}$	Velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1})
%Odo	Porcentagem de oxigênio dissolvido

1 INTRODUÇÃO

Cada vez mais inseridos na sociedade moderna, os materiais plásticos ocupam uma gama de utilidades no dia a dia, bem como, em diversas áreas da indústria. É comum observar que peças inicialmente produzidas com outros materiais, particularmente metal, vidro ou madeira, têm sido substituídos por outras de plásticos (CAMILO et al., 2007).

Em 2010 o consumo brasileiro, apenas em resinas termoplásticas, atingiu 4,9 milhões de toneladas (RETO, 2011); enquanto que o consumo total de produtos plásticos foi de 5,4 mil toneladas. Estes valores refletem a quantidade de resíduos plásticos de origem petroquímica produzido no Brasil, dos quais apenas 15% é reciclado (ABRELPE, 2010).

A grande dificuldade de degradação no meio ambiente, aliado ao crescente aumento da população mundial e ao enorme tempo demandado para a degradação desses resíduos, tem causado grande preocupação ambiental (SQUIO e ARAGÃO, 2004).

Dentre as alternativas para o gerenciamento do descarte de plásticos estão: a incineração, a reciclagem e a bio ou fotodegradação. Entretanto, incineração e reciclagem apresentam alguns problemas associados, como o fato de a incineração ser perigosa, devido à liberação de compostos como dioxanos e furanos, produzidos através do processo de tratamento de certos plásticos (ATLAS e BARTHA, 1997). Além de possuir custo elevado, a reciclagem é um processo demorado, que pode ser limitado pela presença de pigmentos e revestimentos dos plásticos (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005).

Outra alternativa que está sendo bastante estudada é a substituição dos materiais plásticos derivados do petróleo por polímeros de origem biológica. Estes biopolímeros possuem características físico-químicas semelhantes às dos plásticos convencionais, com a vantagem de serem biodegradáveis. Um exemplo são os Polihidroxialcanoatos (PHA).

Os PHAs são poliésteres acumulados por diversas bactérias, na forma de grânulos intracelulares, como reserva de carbono, energia e equivalentes redutores. 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.) (SILVA et al, 2007).

Os PHAs são completamente biodegradáveis em ambientes microbiologicamente ativos. Dentre os PHAs mais estudados, destacam-se o homopolímero poli-3-hidroxibutirato (P(3HB)) e o copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (P(3HB-co-3HV)). Além de serem biocompatíveis, podem ser biossintetizados por bactérias, a partir de diversas fontes de carbono renováveis ou não-renováveis (PRADELLA, 2006).

A produção de PHA em escala industrial é limitada, principalmente, por fatores econômicos que encarecem o produto, diminuindo sua competitividade no mercado, em relação aos derivados químicos.

Pesquisas têm sido feitas no intuito de utilizar fontes de carbono renováveis e mais baratas como as derivadas de soja e milho; resíduos das indústrias de laticínios, como soro de queijo e de leite; resíduos das indústrias sucroalcooleiras, como bagaço de cana; óleos vegetais; bem como, amido de mandioca que é uma excelente fonte de carbono.

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma das principais fontes industriais de amido, sendo cultivada e consumida em todo território brasileiro, uma vez que faz parte da cultura e dieta nacional. Na produção de derivados da mandioca há a geração de resíduos, com elevado teor de matéria orgânica, sólidas e líquidas, que se não forem tratados previamente ao descarte possuem poder poluente. No entanto, estes resíduos apresentam potencial para a produção de energia (FELIPE; RIZATO, 2009). Seu uso como fonte de carbono tem sido bastante estudado em processos biotecnológicos, para a produção de bioetanol, bio-hidrogênio, e podem ser também aplicados na produção de biopolímeros, como os polihidroxialcanoatos.

Entre as diversas variedades de mandioca, a mandiocaba ou mandioca-doce é uma que apresenta baixo teor de amido, quando comparada com a mandioca comum, porém, apresenta elevado teor de açúcares, como glicose, frutose e sacarose (CARVALHO et al., 2004).

Do ponto de vista da produção de polihidroxialcanoatos, a mandiocaba, por apresentar uma elevada concentração de monossacarídeos livres, dispensará a etapa de hidrólise do amido, a qual é onerosa e fundamental para obtenção de glicose a partir do amido. Isto propicia a simples obtenção dos açúcares fermentescíveis, tornando a mandiocaba uma raiz potencialmente atrativa para a produção biotecnológica desse biopolímero, aliado ao fato de obter novas alternativas que não a tradicional produção de farinha e fécula, e a inovação de alternativas de valores agregados à cultura da mandioca.

Neste estudo utilizou-se o extrato de mandiocaba como fonte de carbono, consorciado com um substrato graxo, também de origem vegetal (óleo de andiroba), para a produção de polihidroxialcanoatos de cadeia média (PHA_{MCL}).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a produção de polihidroxialcanoatos de cadeia média (PHA_{MCL}), utilizando extrato de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) puro ou suplementado com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*), como fonte de carbono.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e caracterizar o extrato de mandioca como substrato potencial para a produção de PHA.
- Avaliar o crescimento e acúmulo de PHA por *Pseudomonas oleovorans* a partir do extrato de mandioca, em frascos agitados.
- Estudar a produção de PHA em extrato de mandioca, em bioreator do tipo *Airlift*.
- Avaliar a influência da suplementação do extrato de mandioca, com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*) sobre a produção de PHA_{MCL}.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A MANDIOCABA

A mandiocaba, uma variedade da espécie *Manihot esculenta* Crantz, é uma raiz nativa da Região Amazônica, conhecida regionalmente como mandioca-doce. Essa variedade apresenta características especiais em relação aos seus açúcares constituintes, sugerindo um grande potencial biotecnológico.

Estudos utilizando mandiocaba para produção de etanol apontaram que, enquanto uma tonelada de cana-de-açúcar produz 85 litros de álcool, a mesma quantidade de mandiocaba pode produzir até 211 litros do produto, sem a necessidade da onerosa etapa de hidrólise do amido (CARVALHO, 2009).

Recentemente, organizações empresariais privadas têm demonstrado grande interesse no cultivo dessa variedade de mandioca, disponibilizando trezentos hectares para experimentos agrícolas. Além disso, outros pesquisadores vinculados a instituições Federais de Pesquisa estão realizando estudos para potencializar a utilização biotecnológica da mandiocaba (CRUZ, 2011).

A raiz da mandiocaba apresenta baixo teor de amido, e elevado teor de açúcares, quando comparada com as raízes das variedades da mandioca convencionais. A quantidade de glicose e sacarose pode ser até 100 vezes superior à encontrada em mandiocas comuns, conforme pode ser observado na Tabela 1 (CARVALHO et al., 2004).

Tabela 1. Teor de glicose e sacarose de três acessos de mandiocaba e uma de mandioca.

Acesso	Tipo	Composição (g/100g de matéria seca)	
		Glicose	Sacarose
CAS36.0	Mandiocaba	15,82	7,27
CAS36.1	Mandiocaba	22,47	9,00
CAS36.3	Mandiocaba	15,24	4,92
IAC 12-829	Mandioca	0,08	0,02

Fonte: Adaptado de Souza (2010).

O principal açúcar encontrado tanto na mandiocaba, quanto na mandioca é a glicose. Contudo, na mandiocaba são encontrados outros açúcares e derivados como a manose, que raramente é encontrada na natureza em sua forma livre. Carvalho et al. (2004) quantificaram os açúcares de uma variedade de mandiocaba (CAS36.1), e obtiveram em % mol/mol de

monossacarídeos totais: 16,9 de arabinose; 4,9 de raminose, 1,0 de xilose, 3,6 de ácido glucurônico, 0,5 de ácido galacturônico, 1,6 de manose, 21,7 de galactose e 48,8 de glicose.

A obtenção industrial de açúcares como glicose, frutose, sacarose entre outros, comumente é realizada através da hidrólise do amido, seja por tratamento químico ou físico (ácido, calor e pressão), ou por via enzimática ou microbiológica. Entretanto, estes tratamentos exibem maiores ou menores vantagens, seja com relação à qualidade do produto final ou o tempo de processamento, todas apresentam limitações por seus elevados custos de produção, principalmente quando a via é enzimática (VENTURINI FILHO; MENDES, 2003).

A hidrólise ácida do amido tem como desvantagens evidentes os problemas de corrosão dos equipamentos e a necessidade de neutralização da solução açucarada após a hidrólise. Pode provocar certa destruição de parte dos açúcares, além do fato, de que esse processo pode gerar açúcares não fermentescíveis. (VENTURINI FILHO; MENDES, 2003).

Assim, a mandioca pelas suas características apresenta-se como uma fonte de carbono de fácil acesso, a ser utilizada em bioprocessos, demandando menor custo para o crescimento de microrganismos e produção de metabólitos de alto valor agregado.

Pode-se citar como exemplo sua aplicação para a produção de biopolímeros plásticos biodegradáveis, como os polihidroxicanoatos (PHA). O custo da produção dos PHA é muito alto, quando comparado ao dos plásticos sintéticos não biodegradáveis. Para melhorar a viabilidade econômica e reduzir o preço desse produto é preciso maximizar a conversão de carbono e a produtividade do bioprocessos, além da utilização de fontes de carbono mais baratas (FINKLER, 2006). Neste contexto, a mandioca aparece como uma fonte de carbono bastante acessível para a produção de PHA, pois pode ser utilizada simplesmente extraindo a solução de açúcares de suas raízes, a qual pode ser diretamente utilizada para fermentação, eliminando totalmente os custos de hidrólise para obtenção dos açúcares capazes de sustentar o crescimento bacteriano e a produção do biopolímero.

3.2 POLIHIDROXIALCANOATOS

Polihidroxicanoatos (PHAs) formam uma classe de poliésteres naturais, que podem ser acumulados por diversos microrganismos sob a forma de grânulos intracelulares e podem representar até 80% do peso seco das células. A função mais frequentemente atribuída a estes grânulos é a reserva de carbono, energia e equivalentes redutores (SUDESH et al., 2000).

Cerca de 150 monômeros diferentes já foram identificados como constituintes de PHAs produzidos por bactérias a partir de diversas fontes de carbono. Os monômeros de

PHAs podem ser divididos em dois grupos, o primeiro são os de cadeia curta (PHA_{SCL}), cujas unidades monoméricas contêm de 3 a 5 átomos de carbono na cadeia principal e o segundo são os de cadeia média (PHA_{MCL}), cujos monômeros contêm de 6 a 16 átomos de carbono na cadeia principal. O PHA mais estudado é o poli-3-hidroxibutirato (PHB), um polímero de 3-hidroxibutirato, classificado como um hidroxialcanoato de cadeia curta (COSTA, 2010).

Os PHA_{SCL} são produzidos por bactérias pertencentes aos mais diversos grupos taxonômicos e os PHA_{MCL} são produzidos principalmente por várias espécies de *Pseudomonas* do grupo I de homologia do RNA ribossômico. Uma das características importantes deste grupo é a sua incapacidade em produzir PHB, ou seja, são incapazes de sintetizar PHA_{SCL} (SUDESH et al. 2000). A Figura 1 mostra a representação geral dos PHAs.

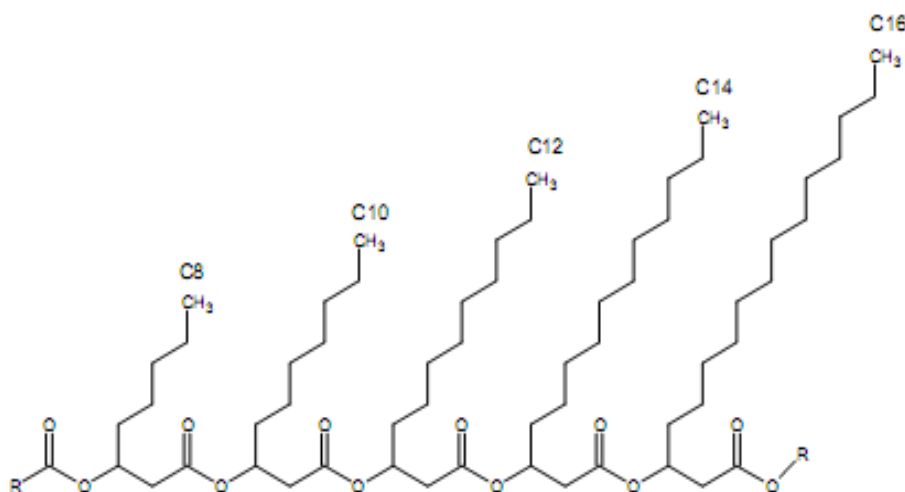


Figura 1. Representação geral dos Polihidroxialcanoatos (PHAs).

A maioria das bactérias do gênero *Pseudomonas* é capaz de produzir polihidroxialcanoatos, não apenas quando elas são cultivadas em alcanos alifáticos ou ácidos graxos, mas também a partir de glicose e de outras fontes de carbono. Por exemplo, *P. putida* quando cultivada em ácido octanóico como fonte de carbono, acumula um co-poliéster constituído por C_{8:0} e C_{12:0} como o principal e o maior constituinte, respectivamente. Entretanto, quando glicose é a fonte de carbono um co-poliéster consistindo principalmente de C_{10:0} é produzido, enquanto que C_{8:0} e C_{12:0} são acumulados minoritariamente. Essa capacidade implica que o metabolismo dos ácidos graxos dessa bactéria (biossíntese *de novo* e β -oxidação) está ligado com biossíntese de PHAs (STEINBUCHEL; LUTKE-EVERSON, 2003).

3.2.1 Histórico

O primeiro pesquisador a descrever o bioplástico, identificado como poli(3-hidroxiбутирато), foi Lemoigne, no Instituto Pasteur, em 1925. O biopolímero foi extraído de *Bacillus megaterium*. Esta primeira observação foi praticamente esquecida até meados da década de 70, quando, devido à crise do petróleo, foi criado um movimento científico que visava descobrir fontes alternativas ao uso de matéria prima de origem petroquímica e, com isso, a identificação de biopolímeros com características físicas e químicas similares aos polímeros derivados do petróleo, produzidos a partir de fontes renováveis de carbono (LUENGO et al., 2003).

Macre e Wilkinson (1958), ao estudarem o *B. megaterium* verificaram que esse microrganismo armazenava homopolímero, principalmente quando as proporções de glicose/nitrogênio no meio estavam altamente elevadas. Dessa maneira concluíram que o P(3HB) era uma fonte de reserva de carbono e energia. Já na década de 60 a descoberta de propriedades termoplásticas aumentou o interesse sobre o plástico biodegradável, levando a empresa W. R. Grace Co. a produzir comercialmente o P(3HB) (ASTAR; GRUYS, 2002).

Em 1973, foram iniciados os estudos de análise do controle metabólico, e em 1974 Wallen e Rohwedder identificaram outros monômeros além do ácido 3-hidroxiбутírico, como poli(3-hidroxiуalerato) em águas residuárias (ANDERSON; DAWES, 1990).

No Brasil, em 1991 foram iniciadas as pesquisas para produção de P(3HB) a partir de processos fermentativos. Em 1992, a cooperativa de produtores de cana-de-açúcar e álcool do estado de São Paulo (COPERSUCAR) estabeleceu um projeto de cooperação técnica a fim de desenvolver pesquisas para a produção de P(3HB), com o Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) e o Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), da Universidade de São Paulo (USP). Em 1993, a COPERSUCAR começou a construir uma unidade piloto para a produção de P(3HB), a qual entrou em funcionamento em 1995 (FORMOLO et al., 2003).

3.2.2 Propriedades

Os PHAs compartilham diferentes propriedades, de acordo com sua composição monomérica. Eles são substâncias lipofílicas, e dentro da célula encontram-se como inclusões insolúveis. São polímeros termoplásticos ou elastoméricos, exibindo um grau de polimerização de até 30.000 unidades, confirmado pelas altas massas molares. Com o aumento no comprimento da cadeia, ou aumento no número de co-monômeros em um copolímero, sua elasticidade aumenta. Praticamente todos são opticamente ativos, devido à

presença de um carbono quiral na posição β da estrutura do monômero. Acredita-se que todos se apresentem somente com a configuração R, devido à estereoespecificidade das enzimas envolvidas na polimerização, sendo, portanto, completamente isotácteis (STEINBÜCHEL, 1996).

A repetição das unidades na estrutura dos PHAs depende das espécies bacterianas e do comprimento da cadeia da fonte de carbono alimentada durante a síntese. Contudo, muitos dos precursores usados para crescimento celular e síntese do polímero podem conter uma ampla variedade de grupos funcionais que, quando inseridos à cadeia polimérica, geram um polímero quimicamente funcional, permitindo modificar as propriedades do material (FULLER, 1999).

A resistência à água, à radiação ultravioleta e a impermeabilidade ao oxigênio tornam o P(3HB) adequado para ser usado na confecção de embalagens alimentícias (WEINER, 1997; GROTHE; YOUNG; CHISTI, 1999).

PHAs como o poli-3-hidroxibutirato P(3HB) são considerados cristalinos, com um grau de cristalinidade variando entre 55 e 80%. Propriedades físicas e mecânicas, como rigidez, ductilidade, ponto de fusão, temperatura de transição vítrea (T_g) e resistência a solventes orgânicos, variam consideravelmente, em função da composição monomérica. As temperaturas de fusão (T_m) e de transição vítrea (T_g) estão intimamente relacionadas à estrutura dos monômeros e à quantidade de co-monômeros, nos copolímeros. Os PHAs tornam-se altamente viscosos e moldáveis em temperaturas próximas, ou acima, de seu ponto de fusão. As T_m e T_g aumentam com o aumento da massa molecular (MM), para os PHAs com baixa MM; porém, este comportamento é invertido, no caso dos PHAs com alta MM (BRANDL et al, 1990, STEINBÜCHEL, 1996).

A composição monomérica, a massa molecular e a distribuição de massas moleculares do polímero são responsáveis pelas propriedades físicas e mecânicas dos PHAs, direcionando sua aplicação. Assim, um maior domínio sobre o processo de síntese permite um melhor controle, seja da composição, seja das massas moleculares ou de sua distribuição, resultando em polímeros feitos sob medida para diferentes aplicações. As propriedades dos PHAs permitem a obtenção de materiais com características rígidas, como o poli-3-hidroxibutirato (P3HB), que apresenta características semelhantes a alguns polímeros de origem petroquímica, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Propriedades de alguns biopolímeros e copolímeros.

Polímero	Ponto de Fusão (°C)	Rigidez (GPa) ^c	Resistência a Pressão (MPa)	Resistência ao Impacto (J m ⁻¹)
3% mol de HV ^a	170	2,9	38	60
9% mol de HV ^a	162	1,9	37	95
14% mol de HV ^a	150	1,5	35	120
20% mol de HV ^a	145	1,2	32	200
25% mol de HV ^a	137	0,7	30	400
P(3HB) ^a	179	3,5	40	50
P(4HB) ^a	53	149	104	–
Polipropileno ^b	170	1,7	34,5	45
Poliestireno ^b	110	3,1	50	21

Fonte: Lee (1996a)

^a Poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxivalerato)

^b Polímeros de origem petroquímica

^c Gigapascal

Biopolímeros mais flexíveis, como os PHA_{MCL}, podem se apresentar como materiais viscosos e aderentes se contiverem grande fração de monômeros insaturados (GOMEZ, 2000). Algumas propriedades de biopolímeros de cadeia média (PHA_{MCL}) e do polímero de origem petroquímica, polipropileno, são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Principais características dos polímeros de cadeia média e polipropileno.

Polímero	Ponto de fusão (°C)	T _g (°C)	Densidade (g cm ⁻³)	Tensão de cisalhamento (MPa)	Resistência à ruptura (%)	Referência
P(3HB) ^a	180	5	1,18-1,25	40	5	Gomes e Neto (1997)
PHO ^a	61	-35	1,02	9	380	Gomes e Neto (1997)
PHO ^a	–	–	–	9,3	250-350	Marchessault et al.(1990)
PHD ^a	56	-39,7	–	–	–	Sánchez et al. (2003)
PP ^b	176	-10	0,905	38	400	Gomes e Neto (1997)

^a Biopolímero de cadeia média (PHA_{MCL}); ^b Polipropileno; **P(3HB)**: poli-(3-hidroxibutirato); **PHO**: poli-(3-hidroxioctanoato); **PHD**: poli-(3-hidroxidecanoato); T_g: temperatura de transição vítrea.

3.2.3 Aplicações dos PHAs

As aplicações do P(3HB) e dos PHAs estão diretamente ligadas às suas propriedades específicas: mecânicas, físicas, térmicas, de biocompatibilidade e de biodegradação, dentre outras (SILVA et al., 2007).

Nos últimos anos o interesse mundial em plásticos bacterianos tem sido muito alto devido à sua ampla variedade de aplicações como materiais para embalagens (CHEN 2009),

em produtos de higiene pessoal, descartáveis e também como um substituto para polímeros sintéticos, tais como o polipropileno (PP) e o poliestireno (PE) (LEE, 1996a; OJUMU et al., 2004).

As propriedades físicas dos PHAs permitem que eles sejam utilizados como substitutos dos plásticos convencionais de origem petroquímica, na maioria das aplicações, como peças desenvolvidas por termoformagem e injeção em moldes, filmes extrudados e fios, dentre outros. Por serem biocompatíveis, encontram na área médica aplicações como fios de sutura, moldes para engenharia de tecidos e matriz para liberação controlada de fármacos (CHEN; WU, 2005). PHA_{MCL} têm sido avaliados para a produção de “scaffolds” (moldes que suportam e dirigem o crescimento das células) em aplicações de engenharia de tecidos (WILLIAMS et al., 1999).

Um aspecto relevante sobre a produção de PHAs é a grande diversidade de monômeros que podem ser a eles incorporados, o que condiciona a realização de produção sob medida para diferentes aplicações.

Apesar de ainda não estarem largamente disponíveis comercialmente, uma série de aplicações potenciais têm sido desenvolvidas para PHA_{MCL}. Devido a sua fácil manipulação na forma de látex, podem ser utilizados como filmes de revestimentos de papel, papelão, entre outros (DE KONING et al., 1997). Babu et al. (1997) verificaram que formulações baseadas em determinados PHAs apresentaram características específicas, boas para adesivos sensíveis à pressão. Van der Walle e colaboradores. (1999) citam a utilização de PHAs produzidos por *P. putida* como agentes ligantes, em formulações de tintas que permitiram as substituições dos solventes orgânicos por água, possibilitando o desenvolvimento de tintas não agressivas ao meio ambiente.

Kim et al. (2007) fazem varias citações de trabalhos em relação as modificação de propriedades de PHA_{MCL}, visando aplicações na área médica: estudos que envolvem *blends* com outros materiais (MALLARDÉ et al., 1998; RENARD et al., 2004; KIM et al., 2005), *crosslinking* (ligações cruzadas) de PHA_{MCL} insaturados, empregando luz ultravioleta (KIM e LENZ al, 2001), raios γ (ASHBY et al., 1998; DUFRESNE et al., 2001) ou peróxidos (GAGNON et al., 1994), ou mesmo a utilização de tratamentos térmicos juntamente com ultravioleta e peróxidos (HAZER et al., 2001; CHUNG, 2005). Substituições químicas nas cadeias laterais em PHA_{MCL} insaturados, introduzindo grupos funcionais tais como epóxi (BEAR et al., 2001), hidroxila (LEE, et al., 2000; EROGLU et al., 2005) ou grupos clorados (ARKIN et al., 2000), também são citadas.

Inserido no panorama apresentado, verifica-se que existe a necessidade de estudos e metodologias que venham a otimizar e condicionar a produção de materiais de PHA_{MCL}, que apresentem as mais diversas composições monoméricas, que possam ser testadas e futuramente ampliem suas aplicações.

3.2.4 Microrganismos produtores e substratos utilizados

Entre os microrganismos que são capazes de acumular PHAs, encontram-se tanto bactérias Gram-positivas como Gram-negativas (BYROM, 1987). Os microrganismos produtores de PHAs são divididos em dois grupos. O primeiro grupo requer a limitação de um dos nutrientes para a produção de PHAs, o qual tem como representantes, entre outros, *Ralstonia eutropha* e *Pseudomonas oleovorans*. O segundo grupo acumula PHAs já durante a fase de crescimento, sendo um representante o *Alcaligenes latus* (LEE, 1996b).

Outros gêneros de bactérias capazes de acumular P(3HB) são: *Aeromonas*, *Actinomycetes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Chlorogloea*, *Chromatium*, *Derxia*, *Ferrobacillus*, *Hyphomicrobium*, *Lampropaedia*, *Methylobacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Sphaerotilus*, *Spirillum*, *Streptomyces*, *Vibrio* e *Zoogloea* (BYROM, 1987).

Azotobacter sp. foi a primeira bactéria escolhida para a síntese industrial de P(3HB), por ser capaz de utilizar sacarose e glicose como substrato. Entretanto foi rejeitada por produzir paralelamente um polissacarídeo, tornando o processo de difícil controle (BYROM, 1987).

Cupriavidus necator tem sido o microrganismo mais estudado e utilizado na produção industrial de PHA, já que apresenta elevados valores de rendimento e velocidade de produção. Além disso, *C. necator* cresce bem em meios mínimos, em várias fontes renováveis de carbono, e acumula até 80% de seu peso seco em polímero. O *C. necator* é amplamente utilizado industrialmente para produção de PHA, em especial P[3HB-co-3HV], que é produzido quando ácido propiônico é adicionado no meio de cultivo, fazendo com que *C. necator* sintetize o copolímero P(3HB-co-3HV), cuja proporção das unidades 3HV dependerá da razão de alimentação de ácido propiônico/glicose, durante a fase de acúmulo do polímero (ANDERSON e DAWES, 1990; BYROM, 1992; KHANNA e SRIVASTAVA, 2005). Na Tabela 4 é apresentado uma síntese de alguns isolados bacterianos utilizadas na produção de PHAs, incluindo suas respectivas fontes de carbono e produção de polímeros e co-polímeros.

Tabela 4. Síntese das principais cepas de bactérias utilizadas na produção de PHAs.

Linhagem bacteriana	Fonte de carbono	Polímero produzido	Referência
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Ácido láurico, ácido oleico	PHA _{MCL}	Lee et al. (2000); Han et al. (2004)
<i>Bacillus cereus</i>	Glicose, ε-caprolactona, beterraba, melão	PHB, Terpolímero	Labuzek e Radecka (2001); Valappil et al. (2007)
<i>Bacillus ssp.</i>	Caldo nutriente, glicose, alcenoatos, ε-prolactona, melão de soja	PHB, PHBV, copolímeros	Shamala et al. (2003); Full et al. (2006)
<i>Burkholderia sacchari</i> sp. nov.	Adonitol, arabinose, celobiose arabitól, frutose, fucose, lactose, maltose, melibiose, rafinose, ramnose, sorbitol, sacarose, trealose, xilitol	PHB, PHBV	Brämer et al. (2001)
<i>Caulobacter crescentus</i> PHB	Meio Caulobacter, glicose	PHB	Qi e Rehm (2001)
<i>Escherichia coli</i> mutants	Glicose, glicerol, óleo de palma, etanol, sacarose, melão	(UHMW)PHB	Nikel et al. (2006); Sujatha e Shenbagarathai (2006)
<i>Halomonas boliviensis</i>	Amido hidrolisado, maltose, maltotetraose e maltohexose	PHB	Quillaguaman et al. (2005)
<i>Legionella pneumophila</i>	Caldo nutriente	PHB	James et al. (1999)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Glicose, ácido oléico, resíduos de ácidos graxos, resíduos de óleo de fritura	PHA _{MCL}	Hoffmann e Rehm (2004); Fernández et al. (2005)
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Ácido octanóico	PHA _{MCL}	Durner et al. (2000)
<i>Pseudomonas putida</i>	Glicose, ácido octanóico, ácido undecenóico	PHA _{MCL}	Tobin e O'Connor (2005)
<i>Pseudomonas putida</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. jessenii</i>	Glicose, monômeros aromáticos	Polímeros aromáticos	Tobin; O'Connor (2005); Ward et al. (2005)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Glicose, óleo de soja, álcool	PHA _{MCL}	(Xu et al., 2005)
<i>Rhodopseudomonas palustres</i>	Acetato, malato, fumarato e succinato, propionato, malonato, gluconato, butirato, glicerina, citrato	PHB, PHBV	Mukhopadhyay et al. (2005)
<i>Cupriavidus necator</i>	Glicose, sacarose, frutose, valerato	PHB, copolímeros	Kim et al. (1995)
<i>Escherichia coli</i> JM109	Glicose, decanoato	PHB	Antonio (2000)

Fonte: Verlinden et al. (2007)

PHA_{MCL}: polihidroxialcanoatos com comprimento de cadeia médio, PHB: poli (3-hidroxibutirato), PHBV: poli (3-hidroxibutirato-co-valerato), UHMW: Peso Molecular Ultra Alto.

A partir do trabalho de Łabuzek e Radecka (2001) foi possível constatar que alguns isolados de *Bacillus* são capazes de produzir PHA terpolimérico (resina conhecida por apresentar propriedades de média/alta resistência ao impacto, média/alta resistência térmica,

alta rigidez, alta dureza). Contudo, foi observado que as condições ambientais desfavoráveis, que induzem a produção de biopolímero, favoreceram a esporulação dessa bactéria, resultando em um conflito entre os dois processos metabólicos, que reduz a produção do biopolímero. É, portanto, promissora a avaliação de mutantes de *Bacillus* não-esporulantes por seu grande potencial de produzir PHAs.

A engenharia genética é uma ferramenta poderosa na otimização do metabolismo microbiano para a produção de polímeros. Cepas de *E. coli* (PARK et al., 2005) foram geneticamente modificadas para produzir PHB com um peso molecular de até 10^7 Da, a partir de glicose. Esses Polímeros chamados PHB de ultra alto peso molecular (UHMW-PHB) podem ser transformados em filmes muito resistentes (KAHAR et al., 2005).

3.2.4.1 *Pseudomonas*

As bactérias do gênero *Pseudomonas* podem produzir tanto polihidroxialcanoatos de cadeia média (PHA_{MCL}), quanto de cadeia lateral longa (PHA_{LCL}) (DE SMET et al., 1983; PREUSTING et al., 1991). As PHA sintases de *Pseudomonas* apresentam especificidades por hidroxilacil-CoA (HA-CoA) de cadeia média (HA_{MCL}-CoA), e estes substratos podem ser produzidos a partir da β -oxidação de ácidos graxos de cadeias longas ou médias. Sendo assim estes ácidos graxos são os substratos para a biossíntese de PHAs nestas bactérias.

Pseudomonas oleovorans é um exemplo de bactéria que sintetiza PHAs de cadeia média utilizando as mais variadas fontes de carbono, incluindo alcoóis e ácidos alcanóicos. O tipo de substrato empregado interfere no crescimento celular, formação de PHA e composição do copolímero (DU e YU, 2002).

Estudos relatam que *P. putida* e *P. aeruginosa* são capazes de acumular PHAs a partir de glicose e outros açúcares, visto que elas são capazes de sintetizar monômeros de cadeia média a partir de acetil-CoA (ARAÚJO, 2005).

Vários substratos de baixo custo têm sido testados para produção de PHAs por *Pseudomonas*, entre os quais pode-se citar o sebo de origem animal. O sebo é composto de uma mistura de triacilgliceróis, contendo principalmente os ácidos oléico, esteárico e palmítico, como seus componentes graxos; e representam substratos interessantes para a produção de PHAs por este gênero de bactéria (MADSON e HUISMAN, 1999). Contudo, a maioria das *Pseudomonas* estudadas não possui atividade de lipase. Apenas *P. resinovorans*, possuem esta atividade, sendo capaz de acumular até 15% de seu peso seco em PHA, a partir do referido substrato (CROMWICK; LENZ, 1996).

3.2.4.2 Utilização de substratos de baixo custo na produção de PHAs

O maior obstáculo na comercialização de PHAs é seu alto custo; aproximadamente 40% do total do custo de produção são atribuídos aos custos dos substratos. Assim, para se conseguir reduzir os custos de produção, uma alternativa é utilizar fontes de carbono mais baratas (CHOI; LEE, 1999).

Em países como o Brasil, onde a cana-de-açúcar é abundante, a sacarose, o melaço e o açúcar invertido são substratos de baixo custo e sua utilização como fonte de carbono na produção de PHAs poderia reduzir os custos de produção. A produção de P(3HB) e copolímeros, integrada à produção de açúcar e álcool em usinas de processamento de cana-de-açúcar, pode representar uma grande oportunidade de produzir polímero a baixo custo e expandir a indústria de cana. Neste caso, a energia necessária aos processos de produção seria proveniente da queima do bagaço de cana, os efluentes do processo e a biomassa resultante após extração do polímero podem ser utilizados como fertilizantes na plantação da cana e os solventes utilizados na purificação do polímero seriam derivados da fermentação alcoólica, naturais e biodegradáveis; portanto, sem representar impacto ambiental (SQUIO, C.R.; ARAGÃO, G.M.F, 2004).

Muitos estudos utilizando amido de mandioca hidrolisado ou efluentes do processamento da mandioca (manipueira) têm sido feitos para os mais diversos fins. Cappelletti (2009) estudou a influência da concentração inicial da água residual do processamento da mandioca (manipueira) na produção de hidrogênio através de fermentação por *Clostridium acetobutylicum*. Lamaison (2009) utilizou manipueira para a produção de hidrogênio utilizando reator em batelada. Krueger (2009) selecionou linhagens de *Bacillus* capazes de produzir polihidroxialcanoatos utilizando manipueira como fonte de carbono.

Costa (2010) avaliou a produção de PHA, utilizando o resíduo de feccularia (manipueira) e óleo usado de soja proveniente de fritura, como fontes de carbono, e linhagens de bactérias (*Pseudomonas sp*) isoladas de solos contaminados com hidrocarbonetos. Na Tabela 5 são apresentados os resultados obtidos pelo autor. O óleo de fritura foi o melhor substrato para a produção de PHA (43 a 50,4%); em manipueira, a produção chegou a 17,6%, com *P.aeruginosa* L2-1; e quando foi utilizada a manipueira e o óleo de soja como um co-substrato, a produção atingiu 39%.

Tabela 5. Síntese dos resultados da pesquisa realizada por Costa (2010), para produção de PHAs, utilizando manipueira e óleo usado de soja, como fontes de carbono, e linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*. Resultados após 120 h de incubação.

Bactéria	Parâmetros	Substrato		
		Manipueira	Óleo de soja	Manipueira/ Óleo de soja
<i>P.aeruginosa</i> L2-1	X (g L ⁻¹ b.s.)	3,3	6,2	4,2
	PHA (%b.s)	17,6	43	39
<i>P.aeruginosa</i> B1-3	X (g L ⁻¹ b.s.)	0,8	6,3	0,9
	PHA (%b.s)	1,2	44	0,4
<i>P.aeruginosa</i> 7a	X (g L ⁻¹ b.s.)	2,5	6,8	3,1
	PHA (% b.s)	4,6	50,4	3,4
<i>P.aeruginosa</i> 6c	X (g L ⁻¹ b.s.)	2,8	6,5	3,2
	PHA (% b.s)	3,8	48,4	12,2

X – crescimento celular; b.s. – biomassa seca. Os cultivos foram feitos em frascos agitados: 25 mL de meio; 30°C e 200rpm.

3.2.5 Biossíntese

A síntese e incorporação de diferentes monômeros de PHA dependem de três fatores determinantes:

- i) O tipo de substrato que será disponibilizado para a bactéria;
- ii) As vias metabólicas existentes nas células bacterianas para que o substrato possa ser convertido no hidroxiacil-CoA desejado;
- iii) A existência de uma enzima denominada PHA sintase, que seja capaz de incorporar o hidroxiacil-CoA sintetizado a uma cadeia polimérica (Figura 2).

Pseudomonas pertencentes ao grupo I de homologia do RNA ribossomal são capazes de acumular PHA a partir de ácidos graxos. Normalmente estes ácidos graxos são pouco miscíveis em água, o que dificulta sua disponibilidade direta ao microrganismo, consequentemente, sua oferta deve ser bem controlada em fermentações (SUN et al., 2007), ou as vezes pode ser utilizada na forma de dispersões aquosas preparadas por intensa agitação, onde as partículas de óleo ficam relativamente mais estáveis (SCHIMIDT et al., 2011).

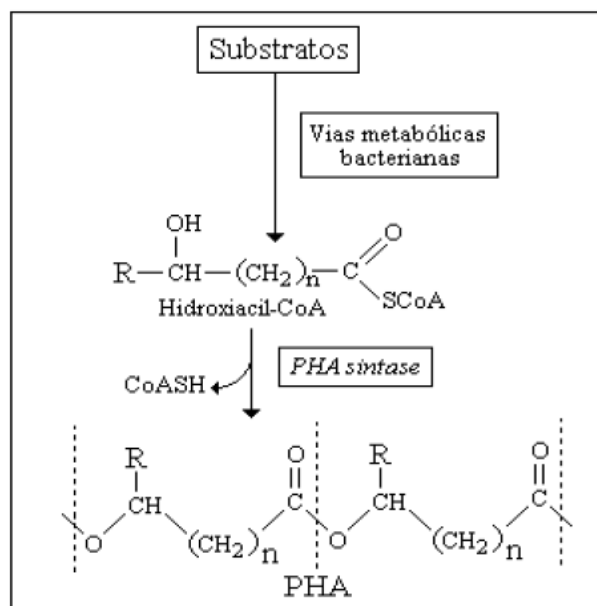


Figura 2. Esquema geral da síntese de PHA. Os três fatores chave que determinam a composição monomérica do PHA estão destacados dentro de retângulos.

Os substratos importantes na formação de PHA_{MCL} são divididos em duas classes: substratos relacionados (hidrocarbonetos, álcoois, ácidos carboxílicos) e não relacionados (glicose, frutose, acetato, glicerol, etc.) (GOMEZ, 2000).

A composição de PHA_{MCL} sintetizados a partir de substratos relacionados está estruturalmente relacionada com o substrato fornecido (TIMM; STEINBÜCHEL, 1990; HUIJBERTS et al., 1992). Por exemplo, ácido nonanóico quando utilizado como substrato resulta em um PHA_{MCL} constituído por cerca de 60 mol% de (R)-3-hidroxinonanoato e 40 mol% de (R)-3 hidroxieptanoato (DURNER et al., 2001).

Três diferentes vias podem ser identificadas para a formação do precursor (3-hidroxiacil-CoA) de PHA_{MCL}, as quais estão ilustradas na Figura 3 (HUIJBERTS et al., 1995; (REHM et al., 1998).

A β-oxidação é a principal via de biossíntese de PHA_{MCL}, quando as bactérias são cultivadas em ácidos graxos (KESSLER; WITHOLT, 2001). Nesse caso, a bactéria incorpora tantos monômeros de acil-CoA quantos a cadeia carbônica do substrato produzir. Esta incorporação depende também da afinidade da PHA-sintase pelo substrato acil-CoA. Em *Pseudomonas* essa afinidade ocorre, preferencialmente, por cadeias de carbono que vão de C₆ a C₁₂ (HUIJBERTS et al., 1995).

Uma segunda via se dá, quando carboidratos são fornecidos. Neste caso, os 3-hidroxiacil são gerados pela síntese *de novo* de ácidos graxos, ou seja, a partir da condensação de moléculas de acetil-CoA (via malonil-CoA), gerando o 3-hidroxiácido que será

incorporado ao polímero. Antes da incorporação ao polímero, o 3-hidroxiacil é transferido do ACP (Acyl Carrier Protein), que é o carreador dos grupos acil na síntese *de novo* de ácidos graxos, para a coenzima-A (CoA), carreadora dos grupos acil na reação de polimerização catalisada pela PHA sintase (REHM; STEINBÜCHEL, 1999).

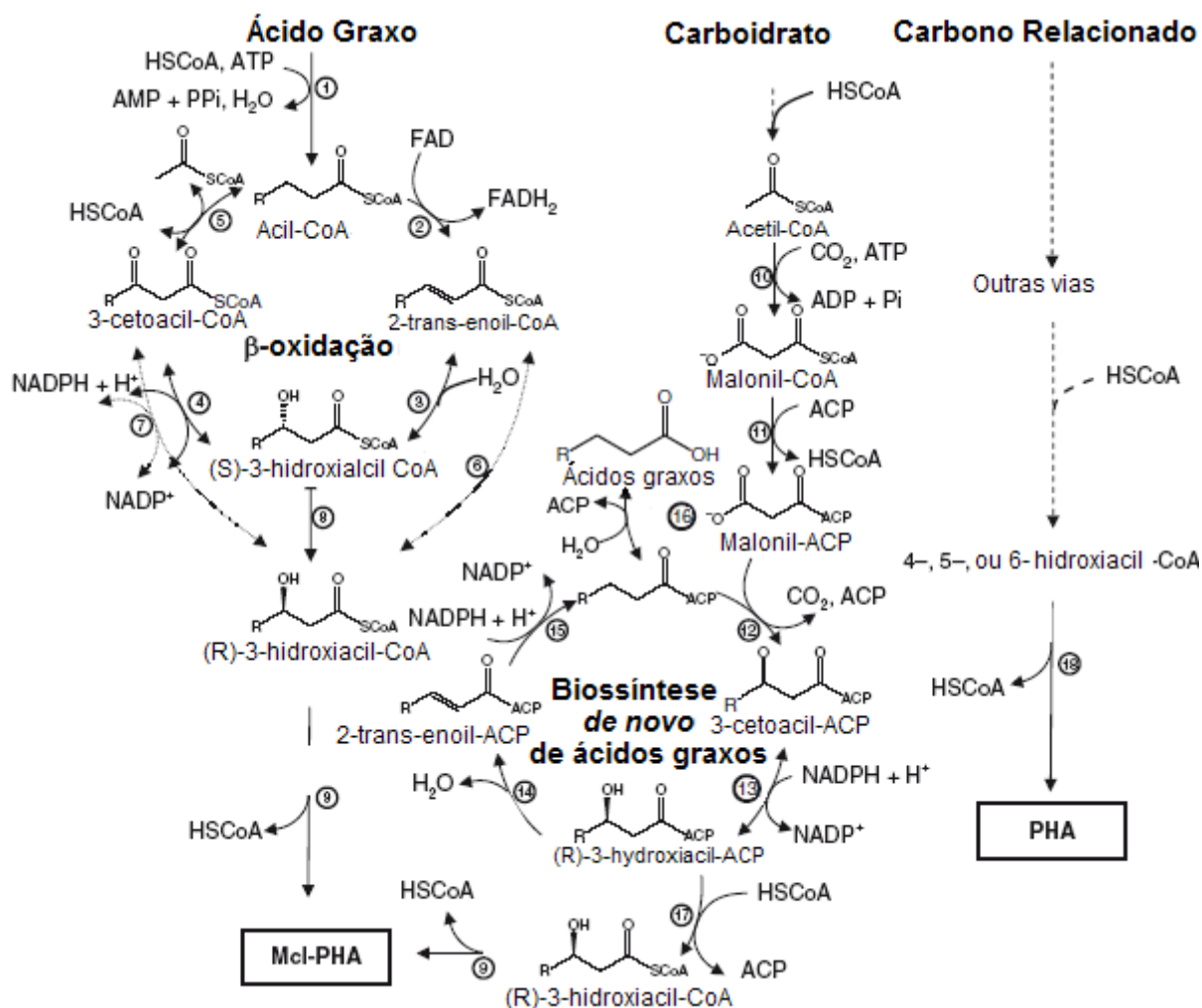


Figura 3. Rotas metabólicas para a biossíntese de PHA_{MCL}. **Fonte:** (STEINBÜCHEL, 2010).

A terceira via de produção de 3-hidroxiacil é baseada na hipótese da presença de monômeros contendo dois carbonos a mais que o substrato fornecido. Huijberts et al. (1995) estudaram a produção de PHA_{MCL} por *P. putida* KT2442, utilizando ácido hexanóico como fonte de carbono. Os autores observaram rotas metabólicas não convencionais no alongamento da cadeia acila, que pode ter ocorrido em condições especiais de crescimento.

A condensação de acetil-CoA com outros acil-CoA intermediários da β-oxidação também pode ocorrer. Essa reação seria catalisada por uma β-cetotiolase. Assim, por exemplo, quando ácido hexanóico é suprido como única fonte de carbono, observa-se a

presença de monômeros contendo oito átomos de carbono (hidroxiocetanoato) (QUEIRÓZ, 2007).

Nesse contexto, pretende-se, através deste estudo, avaliar a capacidade de um isolado padrão de *Pseudomonas oleovorans* produzir PHA, a partir de carboidratos (extrato de mandioca), bem como o efeito da suplementação com uma fonte de ácidos graxos (óleo de andiroba) a ser utilizado simultaneamente, fornecendo unidades monoméricas, a partir da via de β -oxidação de ácidos graxos, conforme as vias citadas acima.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MANDIOCABA

Para a obtenção do extrato utilizado como fonte de carbono foram utilizadas raízes de mandioca cultivadas na Comunidade do Camurituba Centro (Abaetetuba – PA), gentilmente cedidas por um agricultor familiar local.

4.2 ÓLEO DE ANDIROBA

O óleo de andiroba utilizado foi um óleo bruto obtido por prensagem hidráulica direta das sementes de andiroba. O óleo foi cedido pelo laboratório de Operações e Separação (LAOS) da Universidade Federal do Pará.

4.3 MICRORGANISMO UTILIZADO

A bactéria utilizada para os cultivos foi a *Pseudomonas oleovorans* ATCC29347, cedida pelo Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos (LBBMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.4 MEIOS DE CULTURA

4.4.1 Meio Luria Bertani (LB)

Para preparação do pré-inóculo e estocagem da bactéria, foi utilizado o meio Luria Bertani (LB), cuja composição é dada na Tabela 6. Todos os meios foram previamente esterilizados a 121°C por 20 minutos, em autoclave.

Tabela 6. Composição do meio Luria Bertani (LB) utilizado.

Componentes	Concentração (g L ⁻¹)
Triptona	10,0
Extrato de Levedura	5,0
Cloreto de sódio	5,0
Ágar	15,0

Baseado em Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989).

4.4.2 Meio mineral

Para os cultivos, prepararam-se variações de meio mineral, cujas composições são apresentadas nas Tabelas 7 e 8. Todos os meios foram previamente esterilizados a 121 °C por 20 minutos, em autoclave.

Tabela 7. Composição do meio mineral, sem limitação.

Componente	Concentração (g L ⁻¹)
NaHCO ₃	0,5
Citrato Ferroso de Amônia	0,05
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
Oligoelementos ^a	5
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	2,9
KH ₂ PO ₄	2,3

Baseado em Koller et al (2007)

^a mL L⁻¹

Tabela 8. Composição do meio mineral, com limitação de Nitrogênio.

Componente	Concentração (g L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	5,8
KH ₂ PO ₄	3,7
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25
(NH ₄) ₂ PO ₄	1,6
Solução de elementos traços ^a	1

Baseado em Ashby, Solaiman, Foglia (2002)

^a mL L⁻¹

Solução de elementos traços.

Componente	Concentração (g L ⁻¹)
FeSO ₄ .7H ₂ O	10
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,0
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,5
CuSO ₄ .5H ₂ O	1
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,1
Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	0,02

4.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE MANDIOCABA

As raízes de mandioca, após a coleta, foram transportadas, ao ar livre, para o Laboratório de Agroindústria da Embrapa Amazônia Oriental (Belém – PA), onde foram processadas em tempo inferior a 24 horas, para a obtenção do extrato líquido de mandioca (Manipueira), através das etapas apresentadas na Figura 4.

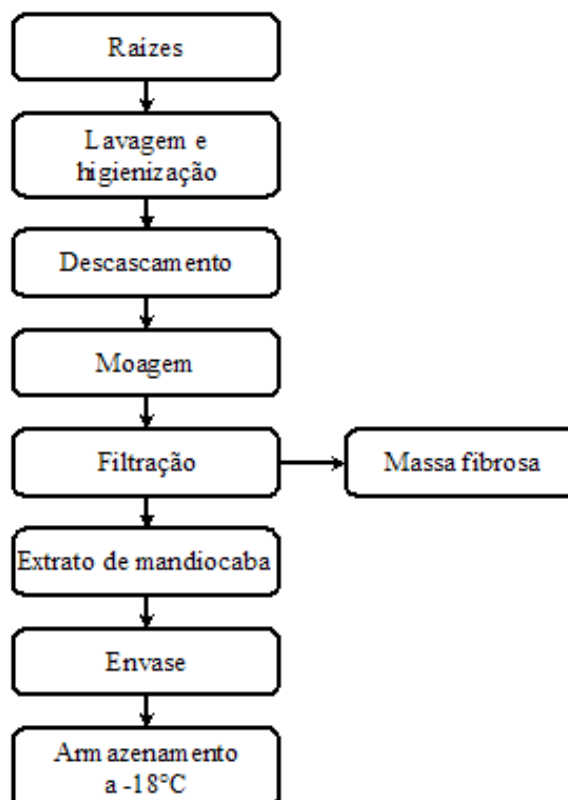


Figura 4. Fluxograma de obtenção do extrato de mandioca (Manipueira).

Primeiramente, foi realizada a lavagem das raízes com água corrente, higienização com água clorada (150 ppm por 15 min) e descascamento manual. Em seguida, as raízes foram moídas em moedor elétrico, obtendo-se uma mistura da parte fibrosa (Figura 5A) com a solução de açúcares (Figura 5B), que posteriormente foram separadas, por filtração através de um tecido de algodão, devidamente higienizado. O extrato obtido (manipueira) foi acondicionado em recipientes plásticos e armazenado a -18°C , até o momento da utilização.

O rendimento (R) do processo de extração do extrato de mandioca foi obtido através da Equação 1.

$$R(\%) = \frac{m_{\text{raíz}} - (m_{\text{casca}} + m_{\text{parte fibrosa}})}{m_{\text{raíz}}} \times 100 \quad (1)$$



Figura 5. (A) massa fibrosa residual da filtração e (B) Extrato da mandiocaba.

4.6 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO EXTRATO DE MANDIOCABA

4.6.1 Determinação de glicose, frutose e sacarose

As concentrações de glicose, frutose e sacarose do extrato de mandiocaba foram determinadas, enzimaticamente (PRAXEDES et al., 2006). De acordo com o método, glicose, frutose e sacarose presentes no extrato são determinadas sequencialmente, num mesmo meio reacional, contendo ATP, NAD⁺ e glicose-6-fostato desidrogenase (G6PDH). Hexocinase, fosfoglicoisomerase e invertase (ou B-fructosidase) são adicionadas, num dado intervalo de tempo, para determinação de glicose, frutose e sacarose, respectivamente. A glicose é fosforilada a glicose -6-fosfato (G6P), pela ação da hexocinase, a partir de ATP. Em seguida, a G6P é oxidada pela G6PDH a Gluconato-6-fosfato, utilizando NAD⁺ como coenzima oxidante. A produção de NADH é detectada pela mudança da intensidade de absorbância a 340 nm, em espectrofotômetro adaptado para leitura de placa de Elisa. A fosfoglicoisomerase (PGI) converte a frutose-6-fosfato (F6P) em G6P e a B-fructosidase converte sacarose em glicose + frutose.

4.6.2 Determinação de umidade, cinzas e proteínas

Umidade – método gravimétrico, em estufa a 105°C, até peso constante, de acordo com a AOAC (1997), método n° 925.10.

Proteínas – método de Kjeldahl, com fator de correspondência nitrogênio-proteína de 6,25, de acordo com a AOAC (1997), método n° 920.87.

Cinzas – método gravimétrico, por incineração da amostra em forno a 550 °C, até peso constante, de acordo com a AOAC (1997), método n° 923.03.

4.7 PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE ANDIROBA

O perfil de ácidos graxos do óleo de andiroba foi obtido por cromatografia gasosa. O óleo foi preparado através de esterificação e saponificação utilizando hidróxido de potássio em metanol (0,1 mol L⁻¹) e ácido clorídrico em metanol (0,12 mol L⁻¹). Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram extraídos com hexano e quantificados em um CG CP 3380 Varian. O cromatógrafo foi equipado com uma coluna capilar CP-Sil 88 (60 m × 0,25 mm) (Varian Inc., EUA) e um detector de ionização de chama. Hélio foi usado como gás de arraste. Utilizou-se uma rampa de temperatura: 3 min a 130 °C, aquecimento gradual até 220 °C por 9 min e 35 min a 220 °C. As temperaturas do detector e do injetor foram de 280 °C e 245 °C, respectivamente. Os picos dos ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção. A curva de calibração foi feita com uma mistura de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos FAME (Nucheck 74X).

4.8 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PHA POR *P. oleovorans* EM FRASCOS AGITADOS

4.8.1 Estudo com *P. oleovorans* utilizando glicose, frutose, sacarose e óleo de andiroba

Para preparo do inóculo, primeiramente a bactéria *P. oleovorans* foi cultivada em meio mineral sem limitação de nutrientes (Tabela 7), a 30 °C e sob agitação (200 rpm), em incubadora com agitação orbital, por 12 horas; em frascos de 125 mL, contendo 20 mL de meio. Como substratos, foram utilizados separadamente, glicose, frutose e sacarose (20 g L⁻¹), como únicas fontes de carbono. O inóculo para os experimentos em que foi utilizado o óleo de andiroba foi feito apenas com glicose como substrato.

Os inóculos foram transferidos na proporção de 10 % do volume para outros frascos de 125 mL contendo 20 mL de meio limitado em nitrogênio (Tabela 8) e as respectivas fontes de carbono, ainda na concentração de 20 g L⁻¹. O conjunto foi mantido a 30 °C, sob agitação (200 rpm), em incubadora com agitação orbital, por 48 horas. Quando o óleo de andiroba foi a fonte de carbono, foi utilizado para o cultivo o meio sem limitação de nutriente (Tabela 7), e a

incubação foi feita nas mesmas condições dos demais ensaios, por 164 horas. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

4.8.2 Estudo com *P. oleovorans* utilizando o extrato de mandioca como única fonte de carbono

Neste experimento utilizou-se como fonte de carbono o extrato de mandioca suplementado com fosfatos (MF), extrato de mandioca suplementado com fosfato e sulfato de amônio (MFS) e extrato de mandioca sem suplementação (M). Para suplementação do extrato foram utilizadas as concentrações de fosfato e sulfato descritas na Tabela 8.

Para a realização dos cultivos, fez-se necessário clarificar e retirar os sólidos em suspensão do extrato de mandioca a fim de obter melhor visualização do crescimento celular, e evitar erros experimentais na pesagem final da biomassa centrifugada.

Ao extrato de mandioca, adicionou-se HCl 1M até pH 3,8 para que os carotenóides que lhe conferem a cor amarela precipitassem. O extrato foi filtrado para separar o precipitado, em seguida foi suplementado, e o seu pH ajustado para 7,0, com NaOH 1 M.

O extrato clarificado e suplementado foi pasteurizado em banho-maria (75°C/30 min), para evitar a degradação dos açúcares, e resfriado até temperatura ambiente (25°C). Após essas etapas fez-se a inoculação da bactéria em capela de fluxo laminar, e o conjunto foi incubado por 24 horas, a 30 °C e 200 rpm, em agitador orbital (Shaker). Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.9 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PHA EM BIORREATOR DO TIPO AIRLIFT

Foram realizados quatro cultivos em biorreator *airlift*, conforme a descrição apresentada a seguir:

Cultivo 1: extrato de mandioca sem diluição com concentração de açúcares totais de $\approx 40 \text{ g L}^{-1}$;

Cultivo 2: extrato de mandioca diluído com água destilada para ajuste da concentração de açúcares totais para $\approx 18 \text{ g L}^{-1}$;

Cultivo 3: extrato de mandioca diluído com água destilada para ajuste da concentração de açúcares totais para $\approx 18 \text{ g L}^{-1}$, acrescido de óleo de andiroba (1 % V/V) e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ na concentração $0,2 \text{ g L}^{-1}$, no tempo de 6,5 h de cultivo;

Cultivo 4: extrato de mandiocaba diluído com água destilada para concentração de açúcares totais de $\approx 13 \text{ g L}^{-1}$, acrescido de óleo de andiroba (1 % V/V) e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ na concentração de $2,4 \text{ g L}^{-1}$, no início do cultivo.

4.9.1 Preparo do inóculo e do meio de cultura para o cultivo em biorreator

Inicialmente, preparou-se um pré-inóculo partindo de uma única colônia isolada em placa de Petri, a qual foi transferida para um frasco erlenmeyer contendo 100 mL de extrato de mandiocaba pasteurizado, suplementado com fosfatos e sulfato de amônio (MFS) (Tabela 8), o qual foi cultivado por 18 horas a 30°C e sob 200 rpm. No preparo do inóculo (Figura 6) para o biorreator, transferiu-se o pré-inóculo para outro frasco contendo 400 mL de extrato de mandiocaba (MFS). O frasco de cultivo foi mantido sob aeração, por injeção de ar esterilizado através da passagem por filtro ($0,2 \text{ }\mu\text{m}$) estéril, utilizando uma bomba de aquário para a injeção de ar. Precedeu-se o cultivo durante 24 horas a 30°C e agitação orbital de 100 rpm. O meio de cultura para o biorreator foi preparado em um recipiente de vidro com cinco litros de volume útil, onde o extrato de mandiocaba foi diluído com água destilada para uma concentração de açúcares totais de aproximadamente 20 g L^{-1} , e adicionado de 1 mL L^{-1} do anti-espumante polipropilenoglicol. Este meio foi aquecido a 100°C , por uma hora, em autoclave. Após resfriamento, o meio foi transferido para o biorreator sob condições assépticas.



Figura 6. Inóculo de *Pseudomonas oleovorans* a partir de extrato de mandiocaba suplementado com fosfatos e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

4.9.2 Equipamento e condições de operação do biorreator

O biorreator utilizado foi do tipo *airlift*, feito em aço inox, apresentado na Figura 7, com circulação externa e volume útil de 5 L. O dispersor de ar acoplado na base do *riser* (parte do biorreator que contém a mistura gás-líquido em fluxo ascendente) era de cerâmica porosa. Um banho termostatizado foi utilizado para controlar a temperatura através de um trocador de calor acoplado no *downcomer* (região que contém o líquido em fluxo descendente). O ar de entrada, proveniente de uma linha de ar comprimido, foi esterilizado utilizando membranas de PTFE (teflon) da Millipore[®], com poros de 0,2 µm. O pH foi controlado automaticamente em $7,0 \pm 0,02$, com solução de NaOH/HCl 2,0 M.

A esterilização dos materiais acessórios e das soluções de ácido e de base foi realizada em autoclave a 121°C por 20 min. O biorreator foi esterilizado com vapor gerado por uma autoclave de 50 L, conectada através de uma derivação da entrada de ar. Após a transferência do meio de cultura, iniciou-se a aeração e, após estabilização da temperatura (30°C) e saturação do meio com oxigênio, calibrou-se o eletrodo de oxigênio dissolvido. Em seguida, o inóculo a $0,5 \text{ g L}^{-1}$ foi assepticamente introduzido. O sistema de controle foi programado para manter a concentração de oxigênio dissolvido acima da crítica, pré-determinada no valor de 13 % da saturação. Para isso, a vazão de ar variou de 0,25 a 1,3 vvm e a pressão de ar no topo do biorreator foi mantida em 0,5 ou 1 atm quando necessário. Para as condições do cultivo 3 e 4, o óleo de andiroba (1% V/V) e o fosfato de amônio ((NH₄)₂HPO₄) ($0,2 \text{ g L}^{-1}$), esterilizados (121°C / 20 min) foram recolhidos por uma seringa cirúrgica de 100 mL, em câmara de fluxo laminar e acoplada no reator por uma entrada previamente esterilizada. A seringa foi acionada às 6 horas e 30 minutos de cultivo. Amostras de 15 mL foram retiradas a cada 1 ou 2 horas para as determinações analíticas.

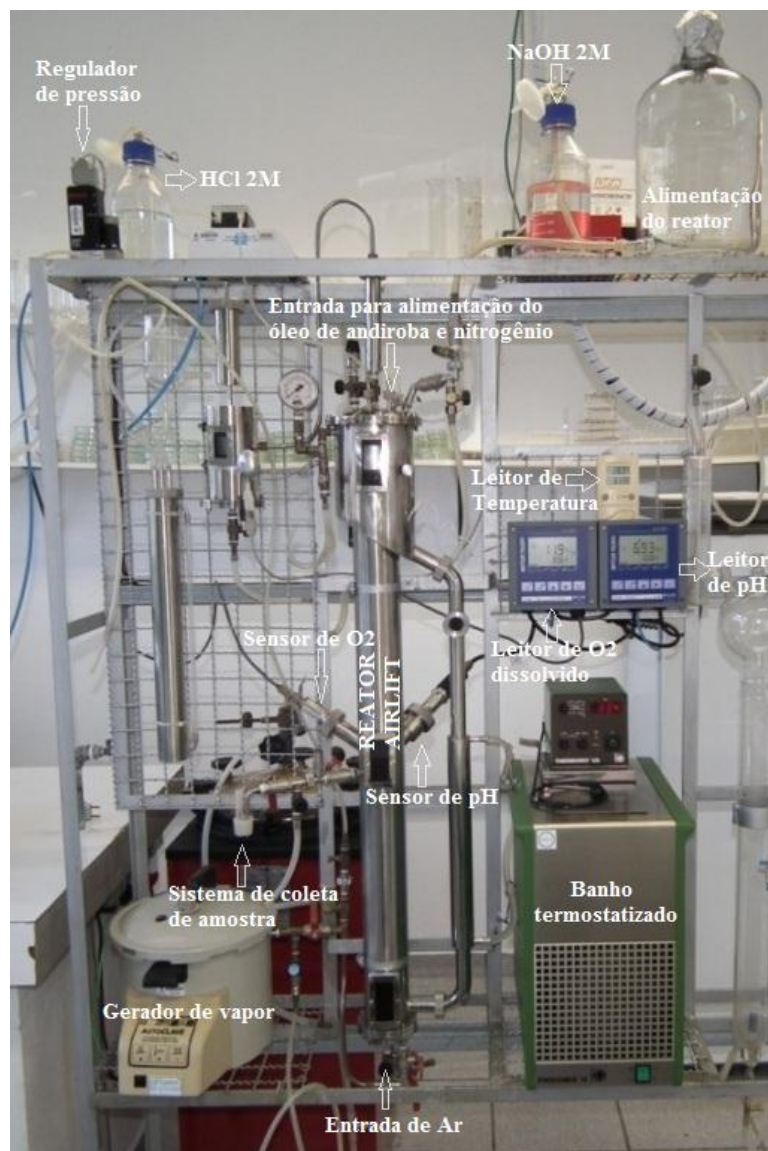


Figura 7. Biorreator *airlift* utilizado nos experimentos.

4.10 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.10.1 Determinação do pH

O pH foi determinado no sobrenadante, após centrifugação da cultura, em potenciômetro (Tecnal TEC-2), utilizando padrões com pH 4,0 e 7,0.

4.10.2 Determinação da biomassa

A concentração celular foi obtida por gravimetria, a partir da diferença de massa de um microtubo de 2 mL. O microtubo foi seco em estufa a 90 °C por 24 horas, e pesado.

Foram feitas cinco centrifugações a 10.000 rpm por 5 minutos, até completar 10 mL de amostra, quando o microtubo foi novamente seco em estufa a 90°C, até peso constante. A diferença entre as massas do microtubo foi considerada como valor da concentração da biomassa seca, em cada amostra.

4.10.3 Quantificação e composição do PHA

A percentagem de acúmulo de PHAs, bem como sua caracterização, foi feita por cromatografia gasosa, conforme método descrito por Braunegg et al. (1978), com as modificações propostas por Brandl et al. (1988).

Foram pesados entre 10 e 35 mg de biomassa seca, em tubos de ensaio com tampa rosqueada, os quais foram ressuspensos em 2 mL de uma solução contendo 15% (V/V) de H₂SO₄, 85% (V/V) de metanol, e ácido benzóico na concentração de 0,4 g L⁻¹, como padrão interno, e 1 mL de clorofórmio. A suspensão foi aquecida em banho-maria (≈100°C) durante quatro horas, e após a segunda hora de aquecimento a mistura foi agitada em agitador de tubos (Vortex), durante 30 segundos, e recolocada no banho-maria por mais duas horas. Após essa etapa, as amostras foram resfriadas durante dez minutos em banho de gelo.

Em seguida foi adicionado 1 mL de água destilada às amostras, agitando cada uma em agitador de tubos durante 30 segundos, e deixando separar as fases. Cerca de 500 µL da fase inferior (orgânica) foi recolhida com auxílio de uma micropipeta e colocada em microtubo de vidro. Foi injetado 1µL da amostra em cromatógrafo gasoso (Shimadzu 2014), equipado com detector de ionização de chama (FID). Foi utilizada uma coluna de sílica fundida (Supelcowax – 10/0,32 mm x 30 m). O gás de arraste foi hidrogênio a 20 mL min⁻¹ e as temperaturas de injeção, de detecção e da coluna foram 250, 280 e 50°C, respectivamente. A curva padrão foi construída utilizando os padrões P(3HO-co-3HHx) (92,71% 3HO e 7,29% 3HHx) e P(3HD-co-3HDd-co-3HO-co-3HHx) (50,59% 3HD, 34,53% 3HO, 15,54% 3HDd e 3,91% HHx), com a massa das amostras variando entre 1,2 e 11,2 mg, seguindo os mesmos procedimentos descritos para a análise dos pontos experimentais.

4.10.4 Determinação dos substratos residuais

A determinação dos açúcares residuais nos cultivos foi realizada pelo método do ácido a 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959), o qual se baseia na redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico, pelo açúcar, a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico, com o desenvolvimento de uma

coloração avermelhada. Para a determinação da concentração dos açúcares, foram utilizadas curvas-padrão de glicose, de frutose e de sacarose, com concentrações de 0 a 0,8 g L⁻¹.

Foi adicionado 1,5 mL da amostra (previamente diluída) em 1,5 mL da solução de DNS. Essa mistura foi aquecida a 100 °C por 15 minutos, e adicionada de 0,5 mL de tartarato duplo de sódio e potássio (sal de Rochell). Resfriou-se o conjunto em banho de gelo e realizou-se a leitura em espectrofotômetro (GBC-UV) a 575 nm. Para quantificação da sacarose residual foi realizada hidrólise ácida previa da amostra, com HCl 10 %, na proporção 1:10 (ácido:amostra), com aquecimento a 100°C, por 2,5 horas. Após resfriamento, foi adicionado NaOH 10 %, na proporção 1:10 (base:amostra), para neutralização do sistema. Posteriormente, foi realizada a determinação dos açúcares liberados, seguindo o mesmo procedimento anterior.

4.10.5 Determinação do nitrogênio residual

O nitrogênio residual foi determinado no sobrenadante das amostras centrifugadas. Para a dosagem foi utilizado o *kit* Ureia ES, enzimático-colorimétrico (Gold Analisa – Brasil), que mede a quantidade de nitrogênio amoniacal do meio (TRINDER, 1969).

4.10.6 Cálculo das grandezas cinéticas

A velocidade específica máxima de crescimento e o fator de conversão de substrato em biomassa e substrato em produto foram calculados com base nas Equações 2, 3 e 4.

$$\ln(X) = \ln(X_o) + \mu_{\max} \cdot t \quad (2)$$

$$Y_{x/s} = -\frac{dX}{dS} \quad (3)$$

$$Y_{p/s} = -\frac{dP}{dS} \quad (4)$$

onde: X = concentração de biomassa (g L⁻¹); X_o = concentração inicial de biomassa (g L⁻¹); $\mu_{\max}$ = velocidade específica máxima de crescimento (h⁻¹); t = tempo (h); Y_{x/s} = fator de conversão de substrato em biomassa (g_x g_s⁻¹); S = concentração de substrato residual (g L⁻¹); Y_{s/p} = fator de conversão de substrato em produto (g_p g_s⁻¹) e P = concentração de produto (g L⁻¹).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE MANDIOCABA

Na etapa de obtenção do extrato de mandioca observou-se que a raiz com casca apresentou um rendimento mássico de 61,4% em extrato, sendo o restante constituído 29,8% por cascas e 8,7% pela parte fibrosa obtida após a prensagem. Estes valores podem ser observados na Tabela 9. O conhecimento desses dados é importante, uma vez que, aliados aos rendimentos e a fatores de conversão de substrato em produtos, dão suporte para calcular, por exemplo, a produção de biopolímeros por hectare de mandioca plantado, e/ou quanto esse processo geraria de resíduo. Dados que são de suma importância, quando se trata de custos em um processo industrial.

Tabela 9. Massas obtidas no processo de extração do extrato de mandioca.

Raiz com casca (kg)	Raiz sem casca (kg)	Casca (kg)	Parte fibrosa (kg)	Extrato (kg)	Rendimento em extrato (%)
47,3	33,2	14,1	4,1	29,1	61,4

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE MANDIOCABA

Os resultados da caracterização do extrato de mandioca são apresentados na Tabela 10. Os valores foram calculados em base úmida. Os dados mostram que do conteúdo total de componentes do extrato de mandioca 5,54 % são carboidratos totais, os quais são constituídos quase que totalmente por glicose, frutose e sacarose, como pode ser observado na Tabela 11. Nota-se, também, que a quantidade de proteínas é baixa (0,19 %), e tomando como base o fator de correspondência de 6,25, a quantidade de nitrogênio total presente no extrato é de apenas 0,03 %.

Tabela 10. Composição físico-química do extrato de Mandioca.

Componentes	Porcentagem média $\pm$ DP (g/100 mL)
Umidade	94,15 $\pm$ 0,11
Cinzas	0,12 $\pm$ 0,08
Proteínas	0,19 $\pm$ 0,03
Carboidratos totais	5,54 $\pm$ 0,13

Tabela 11. Composição em glicose, frutose e sacarose do extrato de mandioca

Açúcar	Concentração Média $\pm$ DP (g/L)	Porcentagem média $\pm$ DP (g/100 mL)
Glicose	22,56 $\pm$ 0,44	2,26 $\pm$ 0,04
Frutose	16,55 $\pm$ 0,64	1,65 $\pm$ 0,06
Sacarose	12,90 $\pm$ 0,89	1,29 $\pm$ 0,09

Na Tabela 11 observa-se que dos açúcares quantificados no extrato de mandioca que representam um total de 5,54 % (g/100mL), a glicose é o principal constituinte. Sendo assim, o extrato obtido e utilizado nos ensaios de cultivo apresenta um percentual adequado aos estudos de produção de PHA por *P. oleovorans*, uma vez que estudos realizados por Santhanam e Sasidharan (2010), demonstraram que uma concentração de 20 g L⁻¹ de glicose ou sacarose já é capaz de promover o crescimento e acúmulo de PHA por esta bactéria.

5.3 AVALIAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE ANDIROBA

Quando óleos vegetais são supridos como fonte de carbono para o crescimento e a produção de PHA, por bactérias, os triacilgliceróis são inicialmente hidrolisados em ácidos graxos e glicerol, pela ação de lipases. Muitas bactérias podem crescer em ácidos graxos de cadeia longa, que são oxidados a acetil-CoA por β -oxidação (WHITE, 2000).

Por esta razão, foi realizada uma caracterização química (Tabela 12), para identificar e quantificar os principais ácidos graxos do óleo de andiroba utilizado com co-substrato no estudo. O perfil de ácidos graxos do óleo de andiroba utilizado está de acordo com os perfis observados por Oliveira (2008), para duas amostras de óleo de andiroba comercial. Os resultados indicam que 79 % da fração graxa do óleo de andiroba é constituída pelos ácidos graxos oléico (50,7 %) e palmítico (28,3 %), os quais são fontes de carbono bastante interessante para produção de PHAs (KOLLER et al, 2010).

Tabela 12. Perfil de ácidos graxos do óleo de andiroba utilizado e comercial.

Ácidos graxos		Óleo de Andiroba	Oliveira (2008)	
		% (p/p)	Amostra 1, % (p/p)	Amostra 2, % (p/p)
C14:0	Mirístico	0,21	0,06	0,05
C16:0	Palmítico	28,29	26,81	25,30
C16:1	Palmitoléico	1,07	0,44	0,88
C18:0	Estearico	8,46	7,72	8,03
C18:1	Oléico	50,70	54,56	53,49
C18:2	Linoléico	9,88	8,09	9,6
C18:3	Linolênico	1,39	0,19	0,17

5.4 EXPERIMENTOS EM FRASCOS AGITADOS

5.4.1 Estudo preliminar da fermentação de *P. oleovorans* no extrato de mandiocaba e seus açúcares constituintes

Nesta etapa, o estudo teve como principal foco a avaliação de fatores básicos de cultivo e desempenho da bactéria, em relação aos principais substratos constituintes do extrato de mandiocaba: a sacarose, a glicose e a frutose. Conforme apresentado na Figura 8, o crescimento de *P. oleovorans* em frascos agitados apresentou o mesmo comportamento, para os substratos glicose e sacarose. Em ambos os casos, a cinética de produção de biomassa apresentou uma fase exponencial com duração de oito a dez horas.

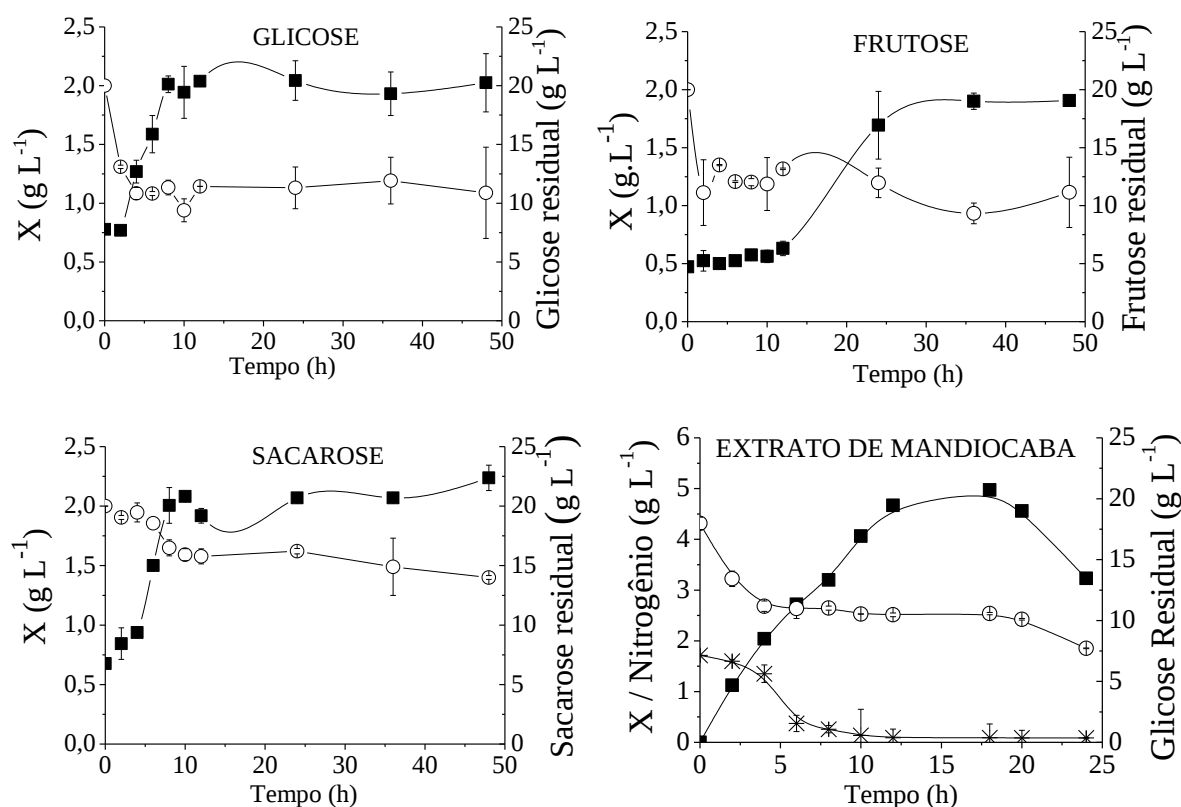


Figura 8. Concentração de biomassa (■), de açúcar redutor residual (○) e de nitrogênio residual (*), nos cultivos utilizando glicose, sacarose, frutose e extrato de mandiocaba como fonte de carbono, ao longo do tempo de cultivo de *P. oleovorans*, em frascos agitados. X = crescimento celular.

Quando a fonte de carbono foi a frutose, observou-se um período de adaptação de doze horas, para que iniciasse o crescimento celular. Embora tenha sido observadas diferenças nos perfis cinéticos de produção de biomassa, essa alcançou uma concentração ao final de 48

horas de aproximadamente 2 g L^{-1} , quando os substratos foram os açúcares puros, indicando algum tipo de limitação no crescimento da bactéria, visto que os açúcares residuais permaneceram entre $11,0$ e 14 g L^{-1} , para glicose/frutose e sacarose, respectivamente. No estudo realizado por Ashby et al. (2002), em condições semelhantes às utilizadas neste estudo, foi observado que a cepa de *P. oleovorans* NRRL B-778 cultivada por 48 horas em frascos agitados produziu uma concentração celular $3,4 \text{ g L}^{-1}$, quando glicose foi utilizada como substrato carbônico. Considerando as diferentes características de diferentes cepas, os resultados apresentados aqui são bastante satisfatórios.

Quando o extrato de mandioca foi utilizado como fonte de carbono, o crescimento celular chegou a $4,9 \text{ g L}^{-1}$, em 18 horas de cultivo, a fase de crescimento teve duração de 12 horas. Foi observado 5 g L^{-1} de açúcar residual no final deste cultivo e o nitrogênio foi quase totalmente consumido em 10 horas.

Em geral, o cultivo de bactérias em frascos apresentam limitações ao crescimento celular, possivelmente devidas à baixa disponibilidade de oxigênio dissolvido e a impossibilidade no controle do pH. De acordo com os resultados apresentados na Figura 9, durante o cultivo em glicose, sacarose e no extrato de mandioca, o valor do pH reduziu de aproximadamente 7,0 para aproximadamente 4,5. Esse parece ter sido o fator mais limitante para a continuidade do crescimento bacteriano, visto que a concentração de nutrientes ainda era suficiente para a continuidade do mesmo.

Quando o substrato utilizado foi a frutose, o comportamento não seguiu o mesmo padrão, pois o pH praticamente não se alterou, se mantendo em aproximadamente 7,0. Esse comportamento demonstra que a assimilação da frutose foi mais difícil, devido não ter ocorrido abaixamento do pH. Estudos como Eagon e Williams (1960) e Roehl et al, (1983) reportam que existe um “grau de impermeabilidade” na membrana celular de *Pseudomonas aeruginosa* devido a um mecanismo de adaptação no transporte deste carboidrato para dentro da bactéria, relacionado com a necessidade de ativação de aceptores enzimáticos responsáveis pela entrada dos açúcares para que ocorra a oxidação intracelular. A observação feita pelos autores pode ser um indicativo para explicar o comportamento de *P. oleovorans* em frutose, já que são bactérias do mesmo gênero.

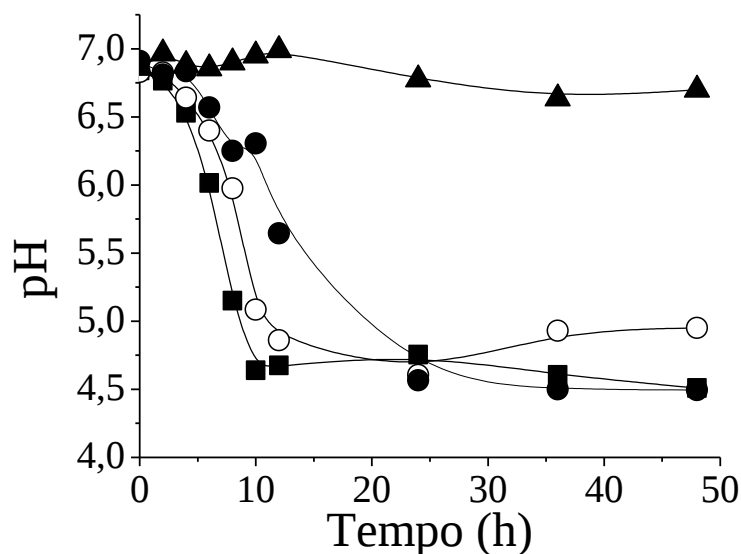


Figura 9. Evolução do pH durante o cultivo em frascos agitados. Glicose (■), Frutose (▲), Sacarose (○), Extrato de mandioca (●).

5.4.2 Comportamento de *P. oleovorans* com óleo de andiroba como fonte de carbono

P. oleovorans foi cultivada também em óleo de andiroba, como fonte de carbono, a fim de verificar a capacidade da bactéria utilizar esse substrato. A primeira observação feita em relação ao cultivo realizado foi que *P. oleovorans* cresceu neste substrato. Esta observação obviamente implica em afirmar que essa bactéria produziu enzimas (lípsases), que hidrolisaram o óleo para a sua assimilação. Matsuda (2009) demonstrou que *P. oleovorans* foi capaz de produzir lipases permitindo crescimento em óleo de soja.

Na Figura 10 são apresentados os perfis de crescimento, consumo de nitrogênio, variação do pH e acúmulo de PHA, para o cultivo de *P. oleovorans* em óleo de andiroba, como único substrato. É possível observar que a biomassa acumulada chegou a $1,2 \text{ g L}^{-1}$ em 24 horas e que esse foi o tempo que durou a fase exponencial de crescimento.

Solaiman, et al (2001) cultivaram *P. oleovorans* em frascos agitados a 30°C e 250 rpm, utilizando óleo de côco, sebo e ácido oléico. Ao utilizarem a linhagem *P. oleovorans* [Pcn51lip-1], observaram um crescimento celular de $1,1 \text{ g L}^{-1}$ em sebo, $0,5 \text{ g L}^{-1}$ em óleo de côco e $3,4 \text{ g L}^{-1}$ em ácido oléico. Com a linhagem *P. oleovorans* NRRL B-14683 as células chegaram a $2,6 \text{ g L}^{-1}$ em ácido oleico e com a linhagem *P. oleovorans* NRRL B-14683+ [pcn51lip-1] chegou a $1,3 \text{ g L}^{-1}$; todos após 72 horas de cultivo e obtidos em base seca. Esses valores são próximos dos obtidos neste estudo, quando se compara com o cultivo em ácido

oléico, uma vez que este é o componente majoritário do óleo de andiroba utilizado neste estudo (Tabela 12).

O pH variou, de 7,0 a 6,5 no final do cultivo, o que indica que a produção de ácidos orgânicos não foi tão intensa quanto nos cultivos que utilizaram carboidratos como fonte de carbono. O consumo de nitrogênio, além de estar relacionado com o crescimento celular, pode estar relacionado com a energia que a célula utilizou para produzir lípases responsáveis pela hidrólise do óleo, para reduzir aos ácidos graxos que foram utilizados como substrato pela bactéria.

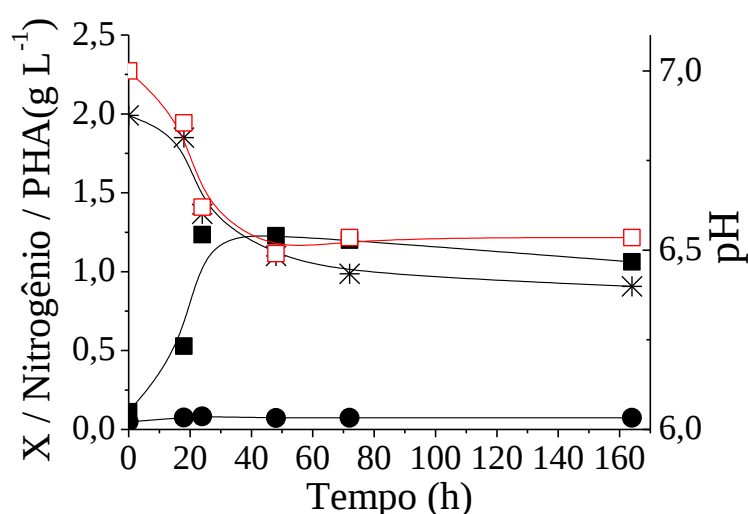


Figura 10. Cultivo de *P. oleovorans* em frasco agitado utilizando óleo de andiroba como fonte de carbono: (■) biomassa (X) (g L⁻¹), (*) nitrogênio (g L⁻¹), (□) pH, (●) PHA (g L⁻¹).

A utilização do óleo pelo microrganismo já foi suficiente para que se pudesse usar este substrato nos experimentos posteriores, em biorreator *airlift*, que promove maior homogeneidade ao meio, facilitando a assimilação dos substratos pelo microrganismo.

Na Figura 10 é apresentada ainda a produção de PHA durante o cultivo em óleo de andiroba. Observa-se que mesmo após 165 horas de cultivo a concentração de PHA não superou 0,1g L⁻¹. A produção de PHA observada por Solaiman, et al (2001) foi superior à encontrada no presente estudo. Os autores obtiveram, com as linhagens, *P. oleovorans* [Pcn51lip-1]: 1,4 g L⁻¹ e *P. oleovorans* NRRL B-14683: 0,9 g L⁻¹, utilizando ácido oléico como substrato. Com a linhagem *P. oleovorans* NRRL B-14683+ [pcn51lip-1] observaram uma produção de 0,5 g L⁻¹, quando óleo de côco foi a fonte de carbono.

Pôde-se verificar, portanto, que *P. oleovorans* assimilou individualmente todos os substratos estudados, além de comparar aspectos cinéticos de consumo de substrato,

crescimento da biomassa, acúmulo de PHA e fatores limitantes de crescimento, como pH, com a utilização do extrato de mandioca e do óleo de andiroba como substratos.

5.4.3 Composição dos polímeros produzidos

No sentido de explorar um pouco mais os dados discutidos anteriormente, foram feitas análises dos biopolímeros produzidos nos diferentes ensaios, em frascos agitados. Na Tabela 13 é apresentada a composição monomérica dos co-polímeros produzidos por *P. oleovorans*, a partir de glicose, frutose, sacarose, extrato de mandioca e do óleo de andiroba, como únicos substratos para o crescimento e acúmulo de PHA.

Tabela 13. Produção de PHA em cultivo de *P. oleovorans*, em frascos agitados, utilizando glicose, sacarose, frutose, extrato de mandioca (MFS) e óleo de andiroba como fontes de carbono.

Substrato	Tempo (h)	X (g L ⁻¹ b.s.)	PHA (g L ⁻¹ b.s.)	PHA (% b.s.)	PHA (mol%)*				
					3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDD
Glicose	24	2,04	0,19	9,50	0,70	Traço	39,96	46,94	12,40
Sacarose	24	3,77	0,08	3,77	3,57	Traço	53,87	5,84	36,70
Frutose	36	1,90	0,11	5,84	4,11	Traço	38,62	31,79	25,48
Extrato de mandioca	24	3,20	0,09	2,50	1,20	Traço	18,47	60,71	19,61
Óleo de andiroba	24	1,23	0,17	9,00	11,57	7,17	18,4	35,42	27,44

X – crescimento celular; b.s. – biomassa seca; * composição monomérica média de PHA; **3HB**: 3-hidroxibutirato; **3HHx**: 3-hidroxi-hexanoato; **3HO**: 3-hidroxioctanoato; **3HD**: 3-hidroxidecanoato; **3HDD**: 3-hidroxidodecanoato.

Nas condições de cultivo do estudo, observou-se a produção de co-polímeros contendo 3-hidroxi-octanoato (3HO), 3-hidroxi-decanoato (3HD) e 3-hidroxi-dodecanoato (3HDD), sendo que para o extrato de mandioca e óleo de andiroba o principal foi o 3-hidroxi-decanoato (3HD). Minoritariamente, foram produzidos ainda copolímeros contendo 3-hidroxi-butirato (3HB) e 3-hidroxi-hexanoato (3HHx). Santhanam e Sasidharan (2010) cultivaram *P. oleovorans* utilizando glicose e sacarose (20 g L⁻¹), e obtiveram 0,65 e 0,60 g L⁻¹ de PHA, respectivamente. Em frutose (20 g L⁻¹), os autores não observaram produção de biopolímero. No presente estudo a produção de PHA foi inferior à relatada por Santhanam e Sasidharan (2010), porém, ao contrário desses autores, observou-se produção de biopolímero, quando o substrato foi a frutose.

A produção de PHA usando extrato de mandioca (0,09 g L⁻¹) foi da mesma ordem de grandeza da observada quando os açúcares puros sacarose (0,08 g L⁻¹) e frutose (0,11 g L⁻¹)

foram utilizados. No caso do óleo de andiroba ($0,17 \text{ g L}^{-1}$) a produção se aproximou da obtida quando o substrato utilizado foi a glicose ($0,19 \text{ g L}^{-1}$) (Tabela 13).

Comparando os resultados do cultivo de *P. oleovorans*, em frascos agitados, utilizando o extrato de mandioca como fonte de carbono, com os observados por Costa (2010), que avaliou a produção de PHA em água residuária de fecularia de mandioca (manipueira) e óleo de soja proveniente de fritura, como fontes de carbono, utilizando quatro linhagens de *Pseudomonas sp.* isoladas de solos contaminados com hidrocarbonetos, pode-se destacar: tanto o crescimento celular ($3,2 \text{ g L}^{-1}$), quanto a produção de PHA (2,5%) no cultivo em extrato de mandioca, estão de acordo com os valores observados pelo autor ($0,8 - 3,3 \text{ g L}^{-1}$ e 1,2 – 4,6%, respectivamente). Quando o óleo foi utilizado como fonte de carbono, Costa (2010) observou crescimento celular ($6,2 - 6,8 \text{ g L}^{-1}$) e produção de PHA (43,0 – 50,4%) bem superiores aos observados nesta pesquisa ($1,2 \text{ g L}^{-1}$ e 9,0%, respectivamente). É importante ressaltar que, tanto no estudo de Costa (2010) quanto no presente estudo, a produção de PHA foi superior quando o óleo foi utilizado como fonte de carbono para o microrganismo.

A Tabela 14 apresenta os parâmetros cinéticos e as grandezas de transformação de todos os cultivos realizados em frascos agitados, onde se observa que a velocidade específica de crescimento ($\mu_{\max}$) foi equivalente para o extrato de mandioca e os açúcares puros glicose e sacarose. Para o óleo de andiroba como substrato, os valores de $\mu_{\max}$ ficaram abaixo dos valores encontrados com todos os outros substratos, exceto em frutose, que foi 50% maior. Os rendimentos de conversão de substrato em biomassa mantiveram-se na mesma ordem de grandeza para os açúcares puros e dobrou quando extrato de mandioca foi utilizado como substrato.

Tabela 14. Parâmetros cinéticos grandezas de transformação para cultivos de *P. oleovorans*, em frascos agitados.

Substrato	$\mu_{\max}$	r^2	$Y_{x/s}$	r^2
Glicose	0,16	0,96	0,22	0,89
Sacarose	0,14	0,96	0,28	0,93
Frutose	0,05	0,88	0,25	0,87
Extrato de Mandioca	0,15	0,98	0,52	0,89
Óleo de andiroba	0,10	0,99	—	—

$\mu_{\max}$ = velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}); $Y_{x/s}$ = fator de conversão de substrato/biomassa ($\text{g}_x \text{ g}_s^{-1}$); r^2 = coeficiente de determinação (adimensional).

5.5 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE PHA EM BIORREATOR AIRLIFT

Nesta etapa, estudou-se a produção de PHA por *P. oleovorans*, por cultivo em batelada, em biorreator do tipo *airlift*. O uso do biorreator possibilitou o controle do pH durante todo o cultivo, o que diminui a inibição do crescimento microbiano devida ao decréscimo do pH e a baixa disponibilidade de oxigênio dissolvido. Avaliou-se a influência da limitação de nitrogênio, sobre o crescimento e produção de PHA e o efeito da adição do co-substrato, óleo de andiroba, sobre o acúmulo do biopolímero.

A Figura 11 apresenta os resultados obtidos no Cultivo 1, no qual o extrato de mandioca foi utilizado como única fonte de carbono. Na Figura 11A é possível observar que o crescimento celular se manteve até 10-12 horas, tempo no qual o nitrogênio havia sido praticamente todo consumido e a partir de onde iniciou uma fase estacionária. Apesar disso, é possível verificar que *P. oleovorans* não consumiu totalmente o substrato, que ao final do cultivo ainda se manteve em aproximadamente 15 g L^{-1} de glicose. O cultivo apresentou um rendimento de conversão $Y_{x/s} = 0,19 \text{ g}_x \text{ g}_s^{-1}$, uma velocidade específica de crescimento $\mu_{\max} = 0,25 \text{ h}^{-1}$, que foi calculada sobre a fase exponencial de crescimento celular, que durou 5 horas. O acúmulo de biomassa, de acordo com a Figura 11A chegou ao máximo de $3,2 \text{ g L}^{-1}$ em 16 horas de cultivo caindo para $3,1 \text{ g L}^{-1}$, ao final de 24 horas (Tabela 16) Durante o cultivo foi determinado a concentração de oxigênio crítica de 13%, abaixo da qual ocorre a limitação pelo oxigênio.

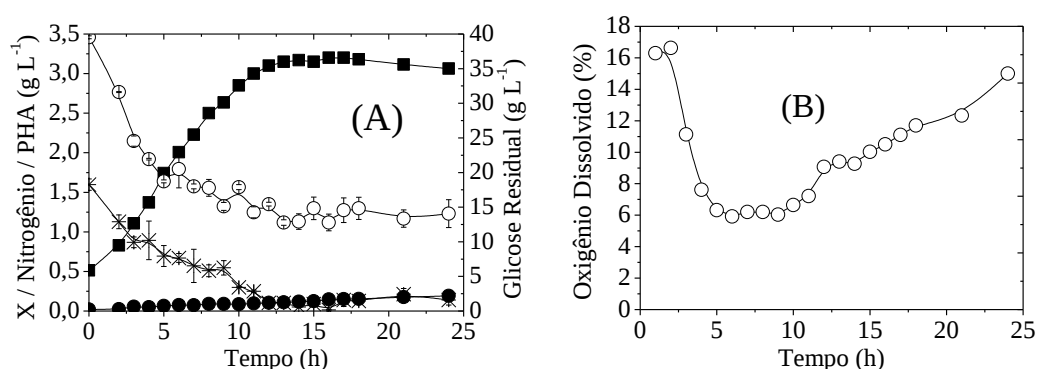


Figura 11. (A) Cultivo 1: extrato de mandioca sem diluição com concentração de açúcares totais de $\approx 40 \text{ g L}^{-1}$; (B) porcentagem de oxigênio dissolvido. (■) Concentração de biomassa; (*) Nitrogênio residual; (○) Glicose residual; (●) PHA.

A Figura 11B mostra que na maior parte do tempo de cultivo havia limitação de oxigênio dissolvido ($OD < 13\%$). Por isso, na primeira hora de fermentação foi necessário pressurizar o biorreator em 0,25 bar, para evitar que a OD chegasse a zero. A partir da terceira hora de cultivo ajustou-se a pressão em 1 bar, a qual foi mantida até o final do experimento. Apesar da alta demanda de oxigênio observada, a hipótese de limitação por estresse osmótico, devido à concentração de substrato, não deve ser desconsiderada, pois uma fase exponencial não ficou bem caracterizada, mesmo quando o oxigênio estava acima da concentração crítica. O PHA produzido chegou a 6,26% em 24 horas e o fator de conversão de substrato em produto ficou em $0,0034 \text{ g}_p \text{ g}_s^{-1}$.

A Figura 12 apresenta os resultados obtidos, na segunda condição experimental (Cultivo 2), no qual o extrato de mandioca foi diluído para uma concentração de açúcares totais de $\approx 18 \text{ g L}^{-1}$. Nesse caso, observou-se uma redução no tempo de crescimento celular em relação ao Cultivo 1, para 8-9 horas, o que pode ser visualizado na linha pontilhada na Figura 12A. A biomassa também atingiu $3,2 \text{ g L}^{-1}$ em 16 horas de cultivo, porém, ao final de 24 horas caiu para $2,9 \text{ g L}^{-1}$ (Tabela 16), inferior ao observado no Cultivo 1.

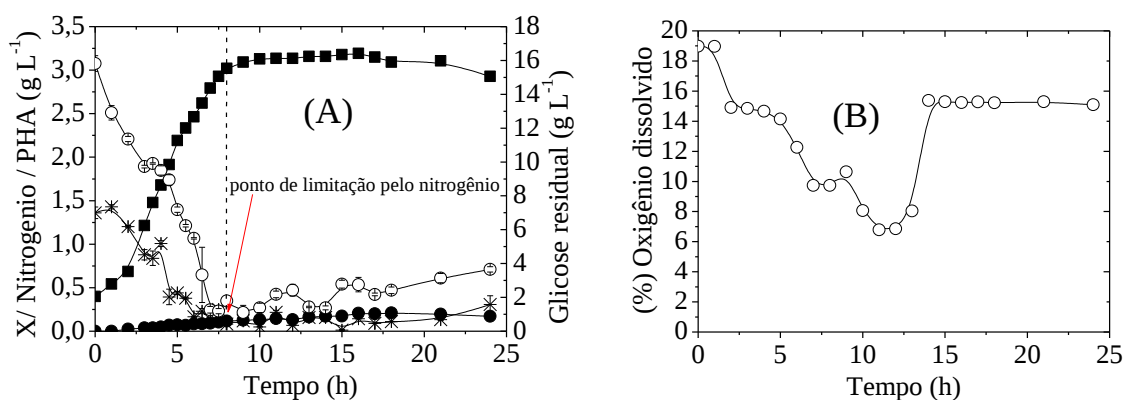


Figura 12. (A) Cultivo 2: extrato de mandioca diluído com água destilada para concentração de açúcares de $\approx 18 \text{ g L}^{-1}$; (B) porcentagem de oxigênio dissolvido. (■) Concentração de biomassa; (*) Nitrogênio residual; (○) Glicose residual; (●) PHA.

A diluição do substrato proporcionou aumento da velocidade específica de crescimento ($\mu_{\max} = 0,36 \text{ h}^{-1}$), e a fase exponencial se estendeu até 5 horas de cultivo, coincidindo com o ponto em que a concentração de oxigênio tornou-se crítica. O fator de conversão de substrato em célula também aumentou ($Y_{x/s} = 0,26 \text{ g}_x \text{ g}_s^{-1}$), e o fator de conversão de substrato em produto $Y_{p/s}$ foi de $0,0084 \text{ g}_p \text{ g}_s^{-1}$, como mostra a Tabela 15. A porcentagem de oxigênio dissolvido (%OD) manteve-se acima da crítica em toda fase

exponencial de crescimento (Figura 12B). Observou-se também que o período de limitação de nitrogênio coincidiu com o final da fase de crescimento celular.

A diluição do substrato propiciou melhores condições de crescimento para a bactéria, porém, um fato interessante foi observado: entre 16 e 18 horas de cultivo o acúmulo médio de PHA atingiu 6,5%, e reduziu para 5,9% ao final de 24 horas de cultivo (Tabela 16). Estudos realizados por Huijberts et al, (1992) identificaram, em *P. oleovorans*, enzimas intracelulares chamadas de PHA despolimerase e Knoll et al, (2009) reportam que esta família de enzimas hidrolisa os grânulos intracelulares de PHA, em condições ambientais extremas. Na Figura 12 pode ser observado que houve limitação de oxigênio dissolvido (Figura 12B), limitação de nitrogênio e quase todo carbono foi consumido (Figura 12A). Desta forma, há um forte indício de que a ação da PHA despolimerase tenha sido a causa da diminuição da porcentagem de PHA acumulado, após 24 horas de cultivo.

No Cultivo 2 foi possível definir o ponto em que ocorreu a limitação de nitrogênio. A partir deste conhecimento tornou-se possível definir uma estratégia experimental na qual fosse possível a manutenção desse ponto de estresse microbiano durante um período maior de tempo, na tentativa de aumentar os níveis de produção de biopolímero. Assim, uma terceira condição experimental foi realizada (Cultivo 3), na qual foi mantida a concentração inicial de substrato em $\approx 18 \text{ g L}^{-1}$, e de nitrogênio em $1,6 \text{ g L}^{-1}$.

No Cultivo 3 foi adicionado óleo de andiroba na concentração de 1% (V/V), e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ na concentração de $0,2 \text{ g L}^{-1}$, a fim de manter a concentração de nitrogênio no ponto definido por mais tempo e verificar a influência do co-substrato lipídico na produção de PHA. O tempo de 6,5 horas foi escolhido para a adição, pois nesse tempo de cultivo a concentração de nitrogênio estaria em aproximadamente $0,3 \text{ g L}^{-1}$, que somada à concentração de $0,2 \text{ g L}^{-1}$ adicionada, manteve a concentração de nitrogênio em aproximadamente $0,6 \text{ g L}^{-1}$, como mostra a Figura 13A. No tempo escolhido para a adição do óleo de andiroba, o cultivo estaria um pouco antes do final da fase de crescimento celular (Figura 13A), e dessa forma minimizaria qualquer interferência no crescimento de célula e ainda haveria um certo tempo para a produção de lipases, responsáveis pela hidrólise e liberação dos ácidos graxos. A estratégia de adição do óleo de andiroba se mostrou interessante, pois permitiu quase triplicar o acúmulo de PHAs (Tabela 16).

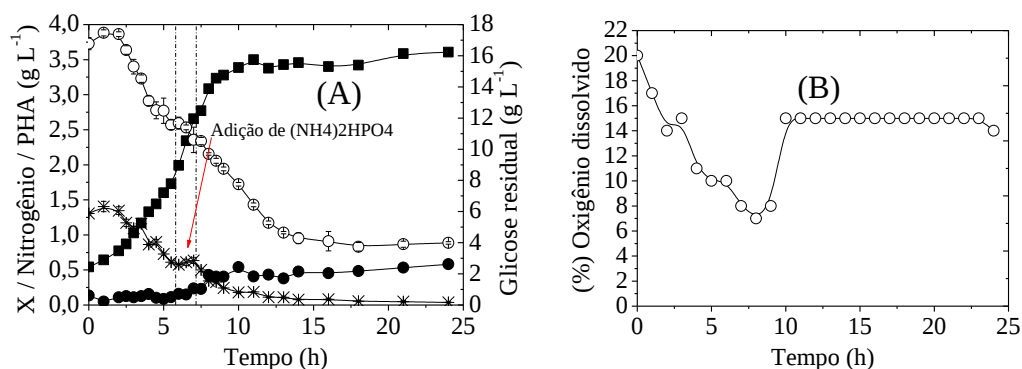


Figura 13. (A) Cultivo 3: extrato de mandioca diluído com água destilada para concentração de açúcares de $\approx 18 \text{ g L}^{-1}$, adicionado de óleo de andiroba (1% v/v) e de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ a $0,2 \text{ g L}^{-1}$ em 6,5 horas de cultivo; (B) porcentagem de oxigênio dissolvido. (■) Concentração de biomassa; (*) Nitrogênio residual; (○) Glicose residual; (●) PHA.

No Cultivo 3, o crescimento celular se estendeu até aproximadamente 10 horas e a fase exponencial de crescimento foi um pouco mais longa em relação aos cultivos anteriores ficando aproximadamente em 8 horas de onde foi calculada a velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{max}} = 0,23 \text{ h}^{-1}$). O fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s} = 0,17 \text{ g}_x \text{ g}_s^{-1}$), foram inferiores ao Cultivo 2, porém o crescimento celular foi superior ($X = 3,61 \text{ g L}^{-1}$) em 24 horas. O fator de conversão de substrato em produto foi de $0,034 \text{ g}_p \text{ g}_s^{-1}$ (Tabela 16). A concentração de oxigênio dissolvido (Figura 13B), também alcançou patamares críticos ($\text{OD} < 13\%$), mas se manteve acima dos valores do Cultivo 1 e abaixo dos valores do Cultivo 2. Isso parece ser uma das razões para a diminuição da μ_{max} (Tabela 15).

Nas condições do Cultivo 3, a produção de PHA manteve-se semelhante no período entre 6 e 7 horas do cultivo, quando houve uma elevação na curva de PHA produzido, chegando a 15% em 24 horas.

Observa-se na Figura 13A que a adição de nitrogênio manteve a concentração constante por aproximadamente três horas, porém, após esse período, continuou a limitar o crescimento. Claramente se percebe, nesse ponto de limitação pelo nitrogênio, que o metabolismo é desacelerado drasticamente, com rápida elevação do %OD acima da concentração crítica (Figura 13B), mantendo a glicose residual em 4 g L^{-1} . Esse comportamento sugere que, nas condições testadas, *Pseudomonas oleovorans* parece acumular PHAs significativamente na fase de desaceleração do crescimento, sob limitação de oxigênio, mas tendo nitrogênio suficiente para manter o crescimento sob condições limitantes, evitando uma parada dos processos metabólicos celulares e de produção também do polímero.

Pela razão suposta, optou-se por elevar a concentração de nitrogênio para $2,4 \text{ g L}^{-1}$ e diminuir a concentração de substrato, para aproximadamente 13 g L^{-1} de açúcares totais, no Cultivo 4 (Figura 14). Além disso, a suplementação com nitrogênio e óleo de andiroba foi realizada no início do cultivo, para que a produção de enzimas fosse induzida desde o início do processo, aumentando a disponibilidade de acil-CoA, produzida via beta-oxidação de ácido graxo (GOMEZ, 2000), para ser prontamente incorporada ao polímero no momento em que as condições de estresse propiciassem a produção de PHA.

O resultados obtidos no Cultivo 4 estão apresentados na Figura 14A, onde se observa um crescimento linear, indicando limitação desde as primeiras horas de cultivo, permitindo que o sistema pudesse manter o oxigênio acima da concentração crítica ($\text{OD} > 13\%$) (Figura 14B). Apesar da biomassa acumulada não superar $1,6 \text{ g L}^{-1}$, o acúmulo de PHAs foi de 15 %, superior em relação ao Cultivo 3. A velocidade específica de crescimento (μ_{max}) foi de $0,27 \text{ h}^{-1}$, e houve um aumento no fator de conversão ($Y_{x/s}$) para $0,23 \text{ g}_x \text{ g}_s^{-1}$, e redução no fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s} = 0,027 \text{ g}_p \text{ g}_s^{-1}$), em relação ao Cultivo 3.

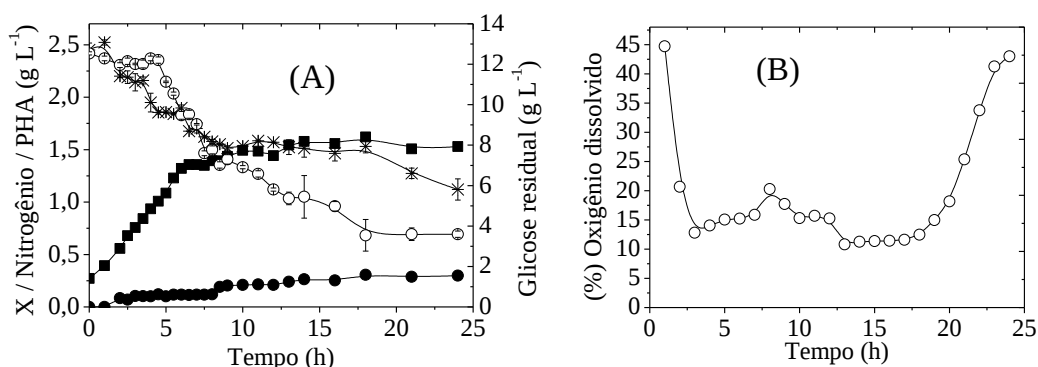


Figura 14. (A) Cultivo 4: extrato de mandiocaba diluído com água destilada para concentração de $\approx 13 \text{ g L}^{-1}$, adicionado de óleo de andiroba (1 % v/v) e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ a $2,4 \text{ g L}^{-1}$, no início do cultivo; (B) porcentagem de oxigênio dissolvido. (■) Concentração de biomassa; (*) Nitrogênio residual; (○) Glicose residual; (●) PHA.

A estratégia adotada nesse último cultivo não permitiu melhorar o desempenho global da produção de biopolímero, visto que um maior acúmulo foi compensado negativamente pelo menor crescimento celular. Os resultados com *P. oleovorans*, embora modestos, apontam para o potencial do extrato de mandiocaba como substrato, associado com o óleo de andiroba, como co-substrato lipídico, na produção de biopolímeros.

Os parâmetros cinéticos e as grandezas de transformação para os cultivos realizados em biorreator *airlift* são sumarizados nas Tabelas 15 e 16, para melhor visualização.

Tabela 15. Parâmetros cinéticos e grandezas de transformação dos cultivos de *Pseudomonas oleovorans*, em biorreator *airlift*.

Ensaio	$\mu_{\max}$	r^2	$Y_{x/s}$	r^2	$Y_{p/s}$	r^2
Cultivo 1	0,25	0,99	0,19	0,88	0,0034	0,90
Cultivo 2	0,36	0,99	0,26	0,94	0,0084	0,92
Cultivo 3	0,23	0,99	0,17	0,97	0,034	0,80
Cultivo 4	0,27	0,99	0,23	0,98	0,027	0,90

$\mu_{\max}$ = Velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}); $y_{x/s}$ = Fator de conversão substrato/biomassa ($g_x g_s^{-1}$); $Y_{p/s}$ = Fator de conversão substrato/produto ($g_p g_s^{-1}$).

Tabela 16. Produção de PHA_{MCL} com *P. oleovorans*, utilizando extrato de mandioca suplementada com fosfatos e sulfato (MFS), em biorreator *airlift*, em 24 horas de cultivo.

Ensaio	X ($g L^{-1}$ b.s.)	PHA ($g L^{-1}$ b.s.)	PHA (% b.s.)	PHA (mol%)*				
				3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDD
Cultivo 1	3,06	0,19	6,24	-	0,58	10,98	54,87	33,57
Cultivo 2	2,93	0,17	5,87	Traço	0,25	6,77	44,56	32,63
Cultivo 3	3,61	0,57	15,96	11,06	11,65	21,87	35,54	19,9
Cultivo 4	1,53	0,28	18,41	12,24	5,42	21,88	40,25	20,21

X – Crescimento celular; b.s. – Biomassa seca. *Composição monomérica média de PHA. **3HB**: 3-hidroxibutirato; **3HHx**: 3-hidroxihexanoato; **3HO**: 3-hidroxi-octanoato; **3HD**: 3-hidroxidecanoato; **3HDD**: 3-hidroxidodecanoato.

Nos quatro cultivos, os co-polímeros produzidos majoritariamente foram 3-hidroxidecanoato (3HD) e 3-hidroxidodecanoato (3HDD). Em menor proporção, foram incorporados os monômeros 3-hidroxibutirato (3HB), 3-hidroxihexanoato (3HHx) e 3-hidroxi-octanoato (3HO) (Tabela 13).

Aponta-se como um resultado interessante deste trabalho a observação da produção de co-polímeros contendo unidades monoméricas de cadeia curta e média. Este tipo de polímero pode ter aplicações bastante específicas e sua produção não é usual. Estes polímeros podem proporcionar propriedades físicas e químicas intermediárias entre polímeros cristalinos como o PHB e elastomérica, como os PHA_{MCL}. Assim, a caracterização física dos PHA_{MCL} produzidos, pode sugerir aplicações bastante promissoras.

Há um aspecto relevante em relação aos resultados estequiométricos obtidos no estudo. De maneira geral, considerando tanto os cultivos em frascos agitados quanto os cultivos em biorreator, os fatores de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$), Tabelas 14 e 15, foram baixos já que as bactérias, geralmente, e nesse caso, as *Pseudomonas* exibem potencial

de conversão de substrato em células bem mais elevado, assim como mostram trabalhos realizados por Gomez, 2000 e Durner et al, 2000. Nesse sentido, surgem questionamentos interessantes em relação ao fluxo metabólico relacionado à produção de PHAs no que diz respeito ao consumo de energia ou até mesmo a impedimentos físicos que os grânulos intracelulares formados poderiam exercer impedindo que a divisão celular aconteça normalmente levando a um baixo crescimento das células.

Especulações a parte, um estudo realizado por Escapa et al 2012, sobre a distribuição de energia envolvida no fluxo metabólico de acúmulo de PHA utilizando linhagem selvagens e geneticamente modificadas de *Pseudomonas putida*, discute que a baixos níveis de nitrogênio ocorre um aumento da síntese de acetil CoA em detrimento ao ciclo de PHA. O excesso de acetil-CoA favorece o ciclo do ácido cítrico aumentando a respiração e a produção de CO₂, ao invés de gerar biomassa dissipando assim, parte da energia. Sugerem ainda, que a síntese de PHA em *P. putida* seria uma forma de canalizar o excesso de energia mantendo assim, o equilíbrio e o balanceamento energético do metabolismo.

Talvez essas informações possam ser um ponto de partida que ajude a explicar a baixa conversão de substrato em célula obtida neste estudo, porém tornam-se necessários estudos mais específicos em relação ao metabolismo de produção de PHA por *P. oleovorans* nas condições propostas por este estudo que venham a responder satisfatoriamente estes questionamentos.

Os estudos iniciais para utilização de extrato de mandioca como substrato principal para a produção de PHAs, utilizando *Pseudomonas oleovorans*, revelam que uma estratégia interessante seria um processo com etapa de crescimento celular separado da produção de biopolímeros. Na etapa de crescimento deve-se tomar cuidado com o suprimento de oxigênio, de modo a manter sua concentração acima da crítica, além de uma adequada relação Carbono/Nitrogênio. Na etapa de produção de biopolímeros, a adição de co-substratos lipídicos e a manutenção de níveis limitantes de oxigênio, são condições importantes. O processo pode ser estudado em biorreator *airlift*, mas sua aplicação nesse tipo de biorreator requer o desenvolvimento de outras estratégias de operação, como a utilização de uma etapa em cultivo contínuo, de modo a se manter baixas concentrações celulares e não haver limitação por oxigênio, seguida por uma etapa paralela em batelada em outro tanque com suplementação de óleos e limitação de oxigênio. Promover a limitação do meio pelo controle de oxigênio é mais prático, do que qualquer outro nutriente.

6 CONCLUSÕES

O alto rendimento em extrato das raízes de mandioca, a facilidade de obtenção do mesmo, e a sua elevada concentração em açúcares simples, fazem desse extrato uma alternativa prática e barata para a utilização em processos fermentativos.

P. oleovorans não conseguiu incorporar níveis elevados de PHA, quando o extrato de mandioca puro foi utilizado como substrato, nas condições estudadas, mas quando o óleo de andiroba foi utilizado como co-substrato, foi possível observar uma evolução bastante interessante no acúmulo de PHA, indicando que tal rotina pode ser melhor explorada para otimizar o processo.

Os resultados obtidos em biorreator *Airlift* sugerem que *P. oleovorans* acumulou PHA sob limitação de oxigênio, em extrato de mandioca como substrato e óleo de andiroba como co-substrato. Controlar o nível do oxigênio dissolvido em biorreatores é muito menos complicado do que controlar a concentração de qualquer outro nutriente.

Condições limitantes extremas devem ser evitadas, pois levam ao consumo dos PHAs produzidos.

REFERÊNCIAS

- ABRELPE (Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais). PANORAMA DOS RESÍDUOS SÓLIDOS NO BRASIL. Edição nº 8, São Paulo, 2010. 199p.
- ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology Review**, v. 54, p. 450-72, 1990.
- ANTONIO, R. V.; STEINBÜCHEL, A.; REHM, B. H. A. Analysis of in vivo substrate specificity of PHA synthase from *Ralstonia eutropha*: formation of novel copolyesters in recombinant *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 182, n. 2000, p. 111-117, 2000.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemistry). **Official method of analysis of AOAC**. 16 ed. Gaithersburg: AOAC, 1997. 1141p.
- ARAÚJO, D.G. **Produção de Poli[3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato] por *Escherichia coli* recombinante a partir de Glicose e Ácido Propiônico**. 2005. 58 f Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- ARKIN, A.H.; HAZER, B.; BORCAKLI, M. Chlorination of poly(3-hydroxyalkanoates) containing unsaturated side chains. **Macromolecules**, v. 23, p. 3319-3223, 2000.
- ASHBY R.D., SOLAIMAN D.K.Y., FOGLIA T.A. The synthesis of short- and medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) mixtures from glucose- or alkanoic acid-grown *Pseudomonas oleovorans*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 147-153, 2002.
- ASHBY, R.D.; CROMWICK, A.M.; FOGLIA, T.A. Radiation crosslinking of bacterial medium-chain-length poly(hydroxyalkanoates) films: effect of epoxidation and curing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 23, p. 61-72, 1998.
- ASTAR, J.; GRUYS, K, J. Biodegradable polymer: Biopol®. In: STEINBÜCHEL, A & DOI, Y. **Biopolymers**. v.4. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.
- ATLAS, R. M; BARTHA, R. Microbial ecology: fundamentals and applications. 3 ed. Oxford: Benjamin Cummings, 1997, 640p.
- BABU, G.N.; HAMMAR, W.J.; RUTHJERFORD, D.R.; LENZ, R.W.; RICHARDS, R.; GOODWIN, S.D. Poly-3-hydroxyalkanoates as pressure sensitive adhesives. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BACTERIAL POLYHYDROXYALKANOATES, 1996, Davos. **Abstract...** Ottawa: NCR Research Press, p. 48-55, 1997.
- BEAR, M.M.; RENARD, E.; RANDRIAMAEFA, F.; LANGLOIS, V.; GUERIN, P. Preparation of a bacterial polyester with carboxy groups in the side chains. **Macromolecular Chemistry**, v. 4, p. 289-293, 2001.
- BRÄMER, C.O., VANDAMME, P., SILVA, L.F.d., GOMEZ, J.G.C. and STEINBÜCHEL, A. *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated

from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1709–1713, 2001.

BRANDL, H., GROSS, R.A., LENZ, R.W., et al. Plastics from bacteria and for bacteria: poly(β -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, v. 41, p. 77-93, 1990.

BRANDL, H.; GROSS, R.A.; LENZ, R.W. e FULLER, R.C. *Pseudomonas Oleovorans* as a source of poly(beta-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1977-1982, 1988.

BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTY, R.M.. Rapid gas chromatographic method for determination of poly-beta-hydroxybutiric acid in microbial biomass. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 29-37, 1978.

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

BYROM, D. Production of poly- β -hydroxybutyrate: poly- β -hydroxyvalerate copolymers. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 103, p. 247-250, 1992.

CAMILO A. N. MONTEIRO, S. A. MIRANDA, O. Guia de referência: embalagens da concepção ao descarte responsável, 1ª edição, São Paulo, 2007. Editora: Instituto de Embalagens.

CAPPELLETTI, B. M., **Efeito da concentração inicial da água residual do processamento da mandioca na produção de biohidrogênio por *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.** 2009. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

CARVALHO, 2009. Mandioca doce da Amazônia surpreende no teste para etanol, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em <http://www.cenargen.embrapa.br/cenargenda/falaram_0309_1/293.pdf>. Acesso em 25/01/2011.

CARVALHO, L.J.C.B.; SOUZA, C.R.B.; CASCARDO, J.C.M.; BLOCH JUNIOR, C.; CAMPOS, L. Identification and chacacterization of a novel starch. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 56, p. 643-659, 2004.

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

CHEN, G.Q. A polyhydroxyalkanoates based bio- and materials industry. **Chemical Society Reviews Articles**, v. 38, p.2434–2446, 2009.

CHOI, J.; LEE, S. Y.; **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 13, 1999.

CHUNG, C.W. Characterization of chemically modified bacterial medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) for biomedical applications. PhD Thesis – **Chungnem National University**, Korea, 2005.

COSTA, S.G.V.A.O. **Estudo da produção de metabólitos por *Pseudomonas aeruginosa*: ramnolipídios e polihidroxicanoatos (phas).** 2010. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências

Biológicas) – Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2010.

CROMWICK, A.M.; FOGLIA, T.; LENS, R.W. The microbial production of poly(3-hydroxyalkanoates) from tallow. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 46, p. 464-469, 1996.

CRUZ, 2011. Amazônia – Portal Gente de Opinião. Mandioca gigante da Pará pesa 37 kilos. Disponível em <http://www.gentedeopinioao.com.br/hotsite/conteudo.php?news=73702>], acessado em 25/01/2011.

DE KONING, G.J.M.; KELLERHALS, M.; VAN MEURS, C.; WITHLOT, B. A process for the production of bacterial medium-chain-length poly[(R)-3-hydroxyalkanoates]: reviewing the status quo. In: international symposium on bacterial polyhydroxyalkanoates, 1996. **Abstractes...** Ottawa: NRC Research Press, p. 137-141, 1997.

DE SMET, M.J.; EGGINK, G.; WITHOLT B.; DAWES E. A. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. **Journal of Bacteriology**, v. 56, p. 3354-3359, 1983.

DU, G.; YU, J. Metabolic analysis on fatty acid utilization by *Pseudomonas oleovorans*: Mcl-poly(3-hydroxyalkanoates) synthesis versus β -oxidation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 325-332, 2002.

DUFRESNE, A.; RECHE, L.; MARCHESSAULT, R.H.; LACROIX, M. Gamma-ray crosslinking of poly(3-hydroxyoctanoate-co-undecanoate). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 29, p. 73-82, 2001.

DURNER, R.; WITHOLT, B.; EGLI, T. Accumulation of Poly[(R)-3-Hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas oleovorans* during growth with octanoate in continuous culture at different dilution rates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3408–3414, 2000.

DURNER, R.; ZINN, M.; WITHOLT, T. B.; EGLI, T. Accumulation of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas oleovorans* during growth in batch and chemostat culture with different carbon sources. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, p. 278–288, 2001.

EAGON, R. G.; WILLIAMS A. K. Enzymatic patterns of adaptation to fructose, glucose, and Mannose exhibited by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 79, p 90–94, 1960.

EROGLU, M.S.; HAZER, B.; OZTURK, T.; CAYKARA, T. Hydroxylation of pendent vinyl groups of poly(3-hydroxy undecanoate) in high yield. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 97, p. 2132-2139, 2005.

ESCAPA, I. F; GARCÍA, J. L.; BÜHLER, B; BLANK, L.; M. PRIETO M. A. the polyhydroxyalkanoate metabolism controls carbon and energy spillage in *pseudomonas putida*. **Environmental Microbiology**, 14(4), 1049–1063, 2012.

FELIPE, F. I., RIZATO, M. Valorização dos resíduos provenientes de fecularias no Brasil. **XIII Congresso Brasileiro de Mandioca**. Botucatu, SP, 2009.

FERNÁNDEZ, D.; RODRIGUEZ, E.; BASSAS, M.; VIÑAS, M.; SOLANAS, A.M.; LLORENS, J.; MARQUÉS, A.M.; et al. Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, p. 159-167, 2005.

FINKLER, L. Produção de polihidroxicanoatos por *Cupriavidus necator* usando ácido acrílico como fonte de carbono. IX, 144 p. 29,7 cm. COPPE/UFRJ, D.Sc., **Engenharia Química- Tese - Universidade Federal do Rio de Janeiro**. RJ, 2006.

FORMOLO, M.C.; DUARTE, M.A.T.; SCHNEIDER, A.L.; FURLAN, S.A.; PEZZIN, A.P.T. Polihidroxicanoatos: biopoliésteres produzidos a partir de fontes renováveis. **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal**, v. 4, n. 2, 2003.

FULL, T.D., JUNG, D.O. and MADIGAN, M.T. Production of poly-beta-hydroxyalkanoates from soy molasses oligosaccharides by new, rapidly growing *Bacillus* species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 377–384. 2006.

FULLER, R.C. Microbial inclusions with special reference to PHA inclusions and intracellular boundary envelopes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 21-29, 1999.

GAGNON, K.D.; LENZ, R.W.; FARRIS, R.J.; FULLER, R.C. Chemical modification of bacterial elastomers: 1 peroxide crosslinking. **Polymer**, v. 35, p. 4358-4367, 1994.

GOMES, J.G.C., NETTO, C.L.B, Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias, **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v. 17, pp. 24-29, 1997.

GOMEZ, J.G.C. **Produção por *Pseudomonas* sp de polihidroxicanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos: avaliação de eficiência, modificação da composição e obtenção de mutantes**. 2000. 155 f. Tese (Doutorado em Microbiologia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

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

HAN, J.; QIU, Y.Z.; LIU, D.C.; CHEN, G.Q. Engineered *Aeromonas hydrophila* for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with alterable monomers composition. **FEMS Microbiology Letter**, v. 239, p. 195–201, 2004.

HAZER, B.; DEMIREL, S.I.; BOCARKLI, M.; EROGLU, M.S.; CAKMAK, M.; ERMAN, B. Free radical crosslinking of unsaturated bacterial polyester obtained from soybean oily acids. **Polymer Bulletin**, v. 46, p. 389-394, 2001.

HOFFMANN, N.; REHM, B.H.A. Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letter**, v. 237, p. 1-7, 2004.

HUIJBERTS, G.N.; DE RIJK, T.C.; DE WAARD, P.; EGGINK, G. ¹³C Nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. **The Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 6, p. 1661–1666, 1995.

HUIJBERTS, G.N.; EGGINK G.; DE WAARD, P.; HUISMAN, G.W.; WITHOLT, B. *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 536-544, 1992.

JAMES, B.W.; MAUCLINE, 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.

KAHAR, P.; AGUS, J.; KIKKAWA, Y.; TAGUCHI, K.; DOI, Y.; TSUGE, T. Effective production and kinetic characterization of ultra-high-molecular-weight poly (R)-3-hydroxybutyrate in recombinant *Escherichia coli*. **Polymer Degradation and Stability**, v. 87, p. 161-169, 2005.

KESSLER B.; WITHOLT B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. **Journal of Biotechnology**, v. 86, p. 97–104, 2001.

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

KIM, D.Y.; KIM, H.W.; CHUNG, M.G.; RHEE, Y.H. Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. **Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 87-97, 2007.

KIM, H.W.; CHUNG, C.W.; KIM, Y.B. RHEE, Y. Preparation and hydrolytic degradation of semi-interpenetrating networks of poly(3-hydroxyundecenoate) and poly(lactide-co-glycolide). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, p. 221–226, 2005.

KIM, H.Y.; PARK, J.S.; SHIN, J.D.; LEE, Y.H. Isolation of glucose utilising mutants *Alcaligenes eutrophus*, its substrate selectivity, and accumulation of PHB. **Journal of Microbiology**, v. 33, p. 51–58, 1995.

KIM, Y.B.; LENZ, R.W. Polyesters from microorganisms. In: SCHEPER, T.; BEBEL, W.; STEINBÜCHEL, A. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, vol.71: Biopolyesters, Berlin: Springer, p. 51-79, 2001.

KNOLL, M.; HAMM, T. M.; WAGNER, F.; MARTINEZ, V.; PLEISS, J. The PHA Depolymerase Engineering Database: A systematic analysis tool for the diverse family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases. **BMC Bioinformatics**, v. 10. P. 10 – 89, 2009.

KOLLER, M.; ATLIĆ, A.; DIAS, M.; REITERER, A.; BRAUNEGG, G. Microbial PHA production from waste raw materials. In. *Plastics from bacteria: Natural Functions and Applications*. 1 ed. Alemanha: Springer, 2010. Volume 14 p. 449. (**Microbiology Monographs**).

KOLLER, M.; BONA, R.; CHIELLINI, E.; FERNANDES, E.G.; HORVAT, P.; KUTSCHERA, C. HESSE, P.; BRAUNEGG, G. Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4854–4863, 2007.

KRUEGER, C. L., **Seleção de linhagens de *Bacillus* produtoras de polihidroxialcanoatos a partir do resíduo do processamento de mandioca**. 2009. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

LABUZEK, S.; RADECKA, I. Biosynthesis of copolymers of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85 strain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 353-357, 2001.

LAMAISSON, F. C., **Aplicação da água residuária do processamento da mandioca como substrato para a produção de hidrogênio por processo fermentativo**. 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

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

LEE, S. Y. Plastic bacteria: Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Trends in Biotechnology**, v. 14, p. 431-438, 1996b.

LEE, S.H.; OH, D.H.; AHN, W.S.; LEE, Y.; CHOI, J.I.; LEE, S.Y. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by high-cell-density cultivation of *Aeromonas hydrophila*. **Biotechnology and Bioengineering**, 67, 240–244, 2000.

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

LUENGO, J.M.; GARCIA, B.; SANDOVAL, A.; NAHARRO, G.; OLIVERA, E.R. Bioplastics from microorganisms. **Current Opinion Microbiology**, v. 6, p. 251-60, 2003.

MACRE, R.M.; WILKINSON, J.F. The influence of culture conditions of poly-3-hydroxybutyrate extracted from different bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 89, p. 245-251, 1958.

MADSON, 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. 1092-2172, 1999.

MALLARDÉ, D.; VALIERE, M.; DAVID, C.; MENET, M.; GUERIN, P. Hydrolytic degradability of poly(3-hydroxyoctanoate) and of a poly(3-hydroxyoctanoate)/poly(R,S-lactic acid) blend. **Polymer**, v. 15, p. 3387-3392, 1998.

MATSUDA, T. S. **Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos de cadeia curta e média a partir de óleos vegetais**. 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MUKHOPADHYAY, M.; PATRA, A.; PAUL, A.K. Production of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate- co-3-hydroxyvalerate) by *Rhodopseudomonas palustris* SP5212. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 765–769, 2005.

NIKEL, P.I., PETTINARI, M.J.; GALVAGNO, M.A.; MENDEZ, B.S. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis by recombinant *Escherichia coli* arcA mutants in microaerobiosis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 2614–2620, 2006.

OJUMU, T.V.; YU, J.; SOLOMON, B.O. Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 18-24, 2004.

OLIVEIRA, B. R. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapa guianensis* e *Copaifera* sp. e estudo da ação repelente frente a *Aedes aegypti***. 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, 2008.

PARK, S.J.; CHOI, J.I.; LEE, S.Y. Engineering of *Escherichia coli* fatty acid metabolism for the production of polyhydroxyalkanoates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 579–588, 2005.

PRADELLA, J. G. C.; Biopolímeros e Intermediários Químicos. Relatório Técnico nº 84 396-205 Centro de Tecnologia de Processos e Produtos Laboratório de Biotecnologia Industrial-LBI/CTPP. Subsídios para Elaboração da Política de Biotecnologia Industrial no Brasil. São Paulo Março, 2006.

PRAXEDES S.C., DAMATTA F.M., LOUREIRO M.E., FERRÃO M.A.G., CORDEIRO A.T. Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canefora* Pierre var. kouillou) leaves. **Environmental and Experimental Botany** 56, 263-273. 2006.

PREUSTING, H.; KINGMA, J.; WITHOLT, B. Physiology and polyester formation of *Pseudomonas oleovorans* in continuous two-liquid-phase cultures. **Enzymes Microbiology and Technology**, v. 13, p. 770-780, 1991.

QI, Q.; REHM, B.H.A. Polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Caulobacter crescentus*: molecular characterization of the polyhydroxybutyrate synthase. **Microbiology**, v. 147, p. 3353–3358, 2001.

QUEIRÓZ, S. R. S. **Estudo do metabolismo de ácidos graxos em *Pseudomonas putida* visando à modulação da composição monomérica de elastômero biodegradável**. 2007. 110 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

QUILLAGUAMAN, J.; HASHIM, S.; BENTO, F.; MATTIASSON, B.; HATTI-KAUL, R. Poly(beta-hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1 using starch hydrolysate as substrate. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 151–157, 2005.

SÁNCHEZ , R., SCHRIPEMA, J., SILVA L.F., TACIRO M.K., PRADELLA G.C., GOMEZ G.C., **European Polymer Journal** . J. 39 1385–1394, 2003.

MARCHESSAULT, R.H., C.J. MONASTERIOS, F.G. MORIN, P.R. SUNDARAJAN, Int. J. **International Journal of Biological Macromolecules**. 12 158–165, 1990.

REHM, B.H.A.; KRUGER, N.; STEINBUCHER, A. A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis – the *phaG* gene from *Pseudomonas putida* KT2440 encodes a 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein coenzyme A transferase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 24044–24051, 1998.

REHM, B.H.A.; STEINBUCHER, A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases proteins required for PHA synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 3-19, 1999.

RENARD, E.; WALLS, M.; GUERIN, Ph.; LANGLOIS, V. Hydrolytic degradation of blends of polyhydroxyalkanoates and functionalized polyhydroxyalkanoates. **Polymer Degradation and Stability**, v. 85, p. 779-787, 2004.

RETO, M. A. S., Cenário internacional pressiona o setor por novas estratégias [Editorial]. **Plástico Moderno**. Edição nº438 - Abril de 2011.

ROEHL R. A.; FEARY, T. W.; PHIBBS Jr., P. V. Clustering of mutations affecting central pathway enzymes of carbohydrate catabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 156, p. 1123-1129, 1983.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTHANAM, A. e SASIDHARAN, S. (2010), Microbial production of polyhydroxy alkanotes (PHA) from *Alcaligenes* spp. and *Pseudomonas oleovorans* using different carbon sources. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 21, p. 3144-3150.

SCHIMIDT, M. IENCZAK J. L. QUINES, L. K. ZANFONATO, K. SCHMIDELL, W. ARAGÃO, G. M. F. Produção de Poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator* com suplementação de óleo de soja miniemulsionado. **XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Caxias do Sul – RS, 2011.

SHAMALA, T.R.; CHANDRASHEKAR, A.; VIJAYENDRA, S.V.N.; KSHAMA, L. Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing *Bacillus* spp. using the polymerase chain reaction (PCR). **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 369–374, 2003.

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

SOLAIMAN, D.K.Y.; ASHBY, R.D.; FOGLIA, T.A.; Production of polyhydroxyalkanoates from intact triacylglycerols by genetically engineered *Pseudomonas* **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 56, p. 664-669, 2001.

SOUZA, H. A.L. **Caracterização e estudo da viabilidade tecnológica do aproveitamento da mandioca**. 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

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

STEINBÜCHEL, A. *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*. 1 ed. Alemanha: Springer, 2010. Volume 14 p. 449. (**Microbiology Monographs**).

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

STEINBÜCHEL, A., P(3HB) and other polyhydroxyalkanoic acids. In: **Products of primary metabolism**, v. 6: **Biotechnology**, VCH, p. 403-464, 1996.

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

SUJATHA, K.; SHENBAGARATHAI, R. A study on medium chain length-polyhydroxyalkanoate accumulation in *Escherichia coli* harbouring phaC1 gene of indigenous *Pseudomonas* sp. LDC-5. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 607-614, 2006.

SUN, Z.; RAMSAY, J.A.; GUAY, M.; RAMSAY, B. Increasing the yield of MCL-PHA from nonanoic acid by co-feeding glucose during the PHA accumulation stage in two-stage fed-batch fermentations of *Pseudomonas putida* KT2440. **Journal of Biotechnology**, v. 132, p. 280-282, 2007.

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

TOBIN, K.M.; O'CONNOR, K.E. Polyhydroxyalkanoate accumulating diversity of *Pseudomonas* species utilizing aromatic hydrocarbons. **FEMS Microbiol Lett**, v. 253, p. 111-118, 2005.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a noncarcinogenic chromogen. **Journal of Clinical Pathology**, 22:158-161, 1969.

VALAPPIL, S.P.; PEIRIS, D.; LANGLEY, G.J.; HERNIMAN, J.M.; BOC- CACCINI, A.R.; BUCKE, C.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized *Bacillus* spp. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 475-487, 2007.

VAN DER WALLE, G.A.M.; BUISMAN, G.J.H.; WEUSTHUIS, R.A.; EGGINK, G. Development of environmentally friendly coatings and paints using medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) as the polymer binder. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.25, p. 123-128, 1999.

VERLINDEN, R.A.J., HILL D.J., KENWARD, M.A., WILLIAMS, C.D., RADECKA I. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology**, 2007.

VENTURINI FILHO, W. G.; MENDES, B. P. Fermentação alcoólica em raízes tropicais. Série: Cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas. Vol.3, cap.19 – Cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas. Fundação Cargill. 2003.

WARD, P.G.; ROO, G.d.; O'CONNOR, K.E. Accumulation of polyhydroxyalkanoate from styrene and phenylacetic acid by *Pseudomonas putida* CA-3. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 2046–2052, 2005.

WEINER, R.M. Biopolymer from marine prokaryotes. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 390-394, 1997.

WHITE, D. The physiology and biochemistry of prokaryotes. 2. Ed. Oxford: Oxford University Press, 2000. p. 565.

WILLIAMS, S.F.; MARTIN, D.P.; HOROWITZ, D.M.; PEOPLES, O.P. PHA applications: addressing the price performance issue I. Tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.25, p. 111-121, 1999.

XU, J.; GUO, B.H.; ZHANG, Z.M.; WU, Q.; ZHOU, Q.; CHEN, J.C.; CHEN, G.Q.; LI, G.D. A mathematical model for regulating monomer composition of the microbially synthesized polyhydroxyalkanoate copolymers. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, p. 821–829, 2005.