

ADRIANA NAVARRO DA SILVA

**PRODUÇÃO OTIMIZADA DE ALGINATO E
PLÁSTICO BIODEGRADÁVEL (POLI-
HIDROXIBUTIRATO) POR *Azotobacter vinelandii***

Dissertação apresentada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos**, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz

São José do Rio Preto
2009

Silva, Adriana Navarro da.

Produção otimizada de alginato e plástico biodegradável (poli-hidroxibutirato) por *Azotobacter vinelandii* / Adriana Navarro da Silva. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2009.

122 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Crispin Humberto Garcia-Cruz

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. *Azotobacter vinelandii*. 3. Poli-hidroxibutirato. 4. Alginato. I. Garcia-Cruz, Crispin Humberto. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 579

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

ADRIANA NAVARRO DA SILVA

**PRODUÇÃO OTIMIZADA DE ALGINATO E PLÁSTICO
BIODEGRADÁVEL (POLI-HIDROXIBUTIRATO) POR
*Azotobacter vinelandii***

Dissertação apresentada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos**, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz
Professor Doutor
UNESP –São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho
Professor Doutor
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –
Francisco Beltrão
Titular

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
Professor Doutor
UNESP - São José do Rio Preto
Titular

Prof. Dr. Hamilton Cabral
Professor Doutor
Universidade de São Paulo –Ribeirão Preto
Suplente

Prof. Dr. Roberto da Silva
Professor Doutor
UNESP – São José do Rio Preto
Suplente

São José do Rio Preto, 19 de fevereiro de 2009.

DADOS CURRICULARES

ADRIANA NAVARRO DA SILVA

NASCIMENTO	29/03/1984 – São José do Rio Preto/SP
FILIAÇÃO	Celson Cruz da Silva Lucinete Rodrigues Navarro da Silva
2002 - 2005	Curso de Graduação Química (Bacharelado e Licenciatura) Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP
2007 - 2009	Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, nível Mestrado, no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP

Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.

“Louis Pasteur (1822 – 1895)”

Ao meu marido Israel
Não há nada mais importante do que o amor demonstrado por meio de atitudes.
Obrigada pela paciência, apoio, incentivo, carinho, dedicação e por ser a
pessoa maravilhosa que é.

AGRADECIMENTOS

Ao Criador, Deus, obrigada pelas dádivas e pelas oportunidades de crescimento concedidas a cada dia; por seres o colo que me consola nos momentos mais difíceis; por seres a luz que me guia quando parece não haver saída; pelos inúmeros amigos que tens colocado em meu caminho e, sobretudo, por seres o amor de todos os que me apoiaram para chegar até aqui.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz, pessoa que admiro muito, pela sua compreensão, suporte, dedicação a este trabalho e acima de tudo por sua grande amizade.

À UNESP – São José do Rio Preto/SP e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação, pelos preciosos ensinamentos durante o desenvolvimento do meu Mestrado.

Ao meu marido, Israel, que algumas vezes foi paciente e animou-me quando estava cansada. Obrigada pelo interesse em me ouvir falar tantas vezes do alginato e PHB.

Aos meus pais, Celson e Lucinete, a quem devo a orientação de vida e que em sua sabedoria, mantiveram-se ao meu lado em todos os momentos de minha vida.

À minha irmã, Luciana, pelo companheirismo, carinho, amor, amizade e apoio.

Aos meus sogros, Florivaldo e Tânia, por incentivarem os meus estudos.

Aos técnicos de laboratório, Ginaldo, Luiz, Newton e principalmente à querida e amiga Tânia pela ajuda e dedicação.

A todos os meus amigos do Curso de Pós-Graduação, Gisele, Bruna, Vidiany, Catharina, Gabriel, Crislene... a todos que direta ou indiretamente participaram no processo de elaboração deste trabalho ou forneceram subsídios sentimentais e afetuosos durante esses anos.

Às minhas amigas, de ontem e hoje, do Laboratório de Biopolímeros, Juliana, Silvia, Lorena, Aline, Carol, Darlene, Fernanda, Daniela, Gabriela... e aos meus amigos, Marcos, Leandro e Luis Gustavo, muito obrigada pelo companheirismo e auxílio.

Ao CNPq pela bolsa de estudo.

Obrigada a todos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVOS	7
2.1. GERAL.....	7
2.2. ESPECÍFICOS.....	7
3. REVISÃO DA LITERATURA	8
3.1. A BACTÉRIA <i>Azotobacter vinelandii</i>	8
3.2. ALGINATO	9
3.2.1. Alginato de algas	9
3.2.2. Alginato bacteriano.....	10
3.2.3. Aplicações e características dos alginatos bacterianos	11
3.2.4. Biossíntese do alginato.....	12
3.2.5. Produção de alginato bacteriano.....	14
3.3. PLÁSTICOS.....	16
3.3.1. Plásticos convencionais.....	18
3.3.2. Bioplásticos ou plásticos biodegradáveis.....	18
3.4. POLI-HIDROXIALCANOATOS	20
3.4.1. Características dos poli-hidroxicanoatos.....	21
3.4.2. Aplicações dos poli-hidroxicanoatos	21
3.4.2.1. Aplicações médicas e farmacêuticas.....	21
3.4.2.2. Aplicações na agricultura.....	23
3.4.2.3. Aplicações em produtos de uso geral	23
3.4.3. Biossíntese do poli-hidroxicanoato.....	23
3.4.4. Produção de poli-hidroxicanoatos.....	26
3.4.5. Métodos de extração e determinação do PHA	26
3.4.6. Biodegradação de poli-hidroxicanoatos	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1. MICRORGANISMO	30

4.2. MEIOS DE CULTURA	30
4.2.1. Meio de Manutenção.....	30
4.2.2. Meio de Fermentação.....	30
4.2.2.1. Meio Mínimo ou Basal	31
4.2.2.2. Meio Mínimo ou Basal com sacarose.....	31
4.2.2.3. Meio Mínimo ou Basal com glicose	32
4.2.2.4. Meio Mínimo ou Basal com melaço de cana-de-açúcar	32
4.3. CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO	33
4.3.1. Preparo do Pré-Inóculo	33
4.3.2. Pré-Fermentação	33
4.3.3. Fermentação e Produção do PHB e alginato.....	33
4.4. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO.....	34
4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	36
4.5.1. Construção da curva de calibração para determinação da concentração celular a partir de suspensões de <i>Azotobacter vinelandii</i> CCT 2841 = DSM 85	36
4.5.2. Determinação da biomassa.....	37
4.5.3. Processo de extração do PHB e alginato.....	37
4.5.4. Purificação do PHB e alginato	39
4.5.5. Determinação da pureza do PHB.....	39
4.5.6. Determinação de açúcares totais e redutores.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1. TESTES PRELIMINARES.....	41
5.1.1. Comparação da eficiência de extração do PHB utilizando diferentes métodos	41
5.1.2. Determinação de açúcares totais e redutores.....	42
5.2. SACAROSE	42
5.2.1. Primeiro Planejamento Experimental	42
5.2.2. Segundo Planejamento Experimental	47
5.3. GLICOSE	53
5.3.1. Primeiro Planejamento Experimental	53
5.3.2. Segundo Planejamento Experimental	58
5.4. MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	65
5.4.1. Primeiro Planejamento Experimental	65
5.4.2. Segundo Planejamento Experimental	70

5.5. PRODUÇÃO DE PHB E ALGINATO NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS PARA O MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	76
5.6. EFEITO DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NAS PRODUÇÕES DE PHB E ALGINATO COM SACAROSE, GLICOSE E MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	77
6. CONCLUSÕES	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
APÊNDICE	89

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura dos blocos homopoliméricos M- e G-, e dos blocos heteropoliméricos MG-, que constituem a molécula de alginato. Na parte superior da figura (A) tem-se uma seqüência M-M; no centro (B) uma seqüência G-G e na parte inferior da figura (C) uma seqüência M-G-M. Adaptado de Smidsrod (1970). 10*
- Figura 2. Rota simplificada da biossíntese de alginato pela Azotobacter vinelandii (adaptado de TRUJILLO-ROLDAN et al., 2003). 13*
- Figura 3. Genes envolvidos na biossíntese de alginato pela Azotobacter vinelandii. 14*
- Figura 4. Estrutura química dos poli-hidroxicanoatos (PHAs): a) poli-hidroxibutirato; b) poli-hidroxivalerato e, c) poli-hidroxibutirato-co-valerato. 20*
- Figura 5. Biossíntese do PHB e ciclo de Krebs na bactéria Azotobacter vinelandii. 24*
- Figura 6. Genes envolvidos na biossíntese de PHB pela Azotobacter vinelandii. 25*
- Figura 7. Reação de hidrólise enzimática da ligação éster por meio da enzima extracelular PHB depolimerase. 29*
- Figura 8. Ciclo de carbono dos poli-hidroxicanoatos. 29*
- Figura 9. Azotobacter vinelandii CCT 2841 = DSM 85 mantida em agar YM. 30*
- Figura 10. Frascos Erlenmeyer estéreis contendo sacarose (solução incolor) ou caldo nutriente (solução amarela). 31*
- Figura 11. Frascos Erlenmeyer estéreis contendo melão de cana-de-açúcar e a fonte de sais (meio mínimo ou basal). 32*
- Figura 12. Crescimento da Azotobacter vinelandii CCT 2841 = DSM 85 em tubos contendo PCA inclinado. 33*
- Figura 13. Frascos Erlenmeyer incubados em agitador orbital rotatório a 120 rpm na temperatura e tempo de incubação pré-determinadas pelo planejamento experimental. 34*

<i>Figura 14. Centrífuga (Jouan GR20.22) utilizada na separação da massa celular do caldo fermentado.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 15. Células separadas do meio fermentado por centrifugação a 6941g durante 15 minutos a 4°C: (a) caldo fermentado contendo melação de cana-de-açúcar como fonte de carbono e, (b) caldo fermentado contendo sacarose como fonte de carbono.</i>	<i>38</i>
<i>Figura 16. Precipitação do PHB com etanol absoluto.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 17. Precipitação do alginato com etanol absoluto.</i>	<i>39</i>
<i>Figura 18. Espectrofotômetro Cintra 5 UV-VIS “DoubleBeam” utilizado na determinação da pureza do PHB.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 19. Superfícies de resposta para: (a) concentração de biomassa (mg mL^{-1}) ao redor dos valores ótimos de concentração de sacarose (g L^{-1}) e temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) (equação: $1,169+0,0061*x+0,0189*y$); (b) concentração de biomassa (mg mL^{-1}) ao redor dos valores ótimos de tempo (h) e temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) (equação: $1,8635-0,0071*x+0,0189*y$).</i>	<i>43</i>
<i>Figura 20. Superfícies de resposta para a produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos da concentração de sacarose (g L^{-1}) e temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) (equação: $-4,62-0,081*x+0,46*y$).</i>	<i>45</i>
<i>Figura 21. (a) Superfícies de resposta para a produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e tempo de incubação (h) (equação: $256,55-4,31*x-0,8966*y$); (b) Superfícies de resposta para a produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de sacarose (g L^{-1}) e tempo de incubação (h) (equação: $106,31+0,3338*x-0,8966*y$).</i>	<i>46</i>
<i>Figura 22. Perfil para predição de valores e desejabilidade (“Profiles for predicted values and desirability”) do primeiro planejamento experimental para sacarose.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 23. Superfícies de resposta para a biomassa (mg/mL) ao redor dos valores ótimos da concentração de sacarose (g L^{-1}) e temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) (equação: $-1,25+0,42*x+0,08*y+0,0011*x^2-0,0074*x*y-0,0009*y^2$).</i>	<i>49</i>

Figura 24. Superfícies de resposta para: (a) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e tempo de incubação (h) (equação: $-14,45-0,65*x+2,22*y+0,025*x^2-0,039*x*y-0,008*y^2$); (b) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de sacarose (g L^{-1}) e temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) (equação: $111,29-13,02*x-3,05*y+0,34*x^2+0,18*x*y+0,025*y^2$); (c) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de sacarose (g L^{-1}) e temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) (equação: $6083,66-72,24*x-260,50*y-2,27*x^2+2,26*x*y+2,80*y^2$); (d) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e tempo de incubação (h) (equação: $4424,19-203,39*x+8,96*y+2,80*x^2-1,32*x*y+0,66*y^2$). 50

Figura 25. (a) Superfícies de resposta para a biomassa (mg/mL) ao redor dos valores ótimos da concentração de glicose (g L^{-1}) e temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) (equação: $2,83-0,0099*x-0,0097*y$); (b) Superfícies de resposta para a biomassa (mg/mL) ao redor dos valores ótimos da concentração de glicose (g L^{-1}) e tempo de incubação (h) (equação: $0,1542-0,0099*x+0,0328*y$). 54

Figura 26. Superfícies de resposta para: (a) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de glicose (g L^{-1}) e tempo de incubação (h) (equação: $691,41+10,9*x-10,55*y$); (b) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de glicose (g L^{-1}) e temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) (equação: $726,18+10,9*x-24,45*y$); (c) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) e tempo de incubação ($^{\circ}\text{C}$) (equação: $1813,14-24,45*x-10,55*y$); (d) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de glicose (g L^{-1}) e pH (equação: $1683,61+10,9*x-250,31*y$). 55

Figura 27. Superfícies de resposta para: (a) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de glicose (g L^{-1}) e temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) (equação: $183,36+1,85*x-5,57*y$); (b) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de glicose (g L^{-1}) e tempo de incubação (h) (equação: $142,43+1,85*x-1,94*y$). 57

Figura 28. Perfil para predição de valores e desejabilidade (“Profiles for predicted values and desirability”) do primeiro planejamento experimental para glicose. 58

Figura 29. (a) Superfícies de resposta para a biomassa (mg/mL) ao redor dos valores ótimos da concentração de glicose ($g L^{-1}$) e temperatura de incubação ($^{\circ}C$) (equação: $2,12+0,039*x-0,00070*x^2-0,12*y-0,0015*y^2+0,0015*x*y$); (b) Superfícies de resposta para a biomassa (mg/mL) ao redor dos valores ótimos da concentração de glicose ($g L^{-1}$) e tempo de incubação (h) (equação: $2,12+0,039*x-0,00070*x^2-0,096*y-0,0000094*y^2+0,00044*x*y$); (c) Superfícies de resposta para a biomassa (mg/mL) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e temperatura de incubação ($^{\circ}C$) (equação: $2,12-0,12*y-0,0015*y^2-0,096*x-0,0000094*x^2+0,00036*y*x$). 61

Figura 30. Superfícies de resposta para: (a) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de glicose ($g L^{-1}$) e tempo de incubação (h) (equação: $75469,44-1409,96*x+10,08*x^2+828,52*y+3,27*y^2-11,61*x*y-64165,28$); (b) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e temperatura de incubação ($^{\circ}C$) (equação: $75469,44-4838,92*y+86,25*y^2+828,52*x+3,27*x^2-19,07*y*x-48320,26$); (c) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de glicose ($g L^{-1}$) e temperatura de incubação ($^{\circ}C$) (equação: $75469,44-1409,954*x+10,08*x^2-4838,92*y+86,25*y^2+32,18*x*y$). 62

Figura 31. Superfícies de resposta para: (a) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de glicose ($g L^{-1}$) e temperatura de incubação ($^{\circ}C$) (equação: $-573,46+5,95*x-0,063*x^2+37,37*y-0,77*y^2+0,049*x*y$); (b) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de glicose ($g L^{-1}$) e tempo de incubação (h) (equação: $-573,46+5,95*x-0,063*x^2+1,66*y-0,011*y^2+0,0093*x*y$); (c) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e temperatura de incubação ($^{\circ}C$) (equação: $-573,46+37,37*y-0,77*y^2+1,66*x-0,011*x^2-0,12*y*x$). 63

Figura 32. (a) Superfícies de resposta para a biomassa (mg/mL) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e temperatura de incubação ($^{\circ}C$) (equação: $6,17+0,34*x-0,13*y$); (b) Superfícies de resposta para a biomassa (mg/mL) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e tempo de incubação (h) (equação: $1,23+0,34*x+0,011*y$). 65

Figura 33. Superfícies de resposta para: (a) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e temperatura de incubação (°C) (equação: $-261,29+36,68*x+7,68*y$); (b) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e tempo de incubação (h) (equação: $88,73+36,68*x-1,39*y$); (c) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e pH (equação: $102,06+36,68*x-16,26*y$). 67

Figura 34. Superfícies de resposta para: (a) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e tempo de incubação (h) (equação: $36,43-0,0053*x-0,31*y$); (b) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e temperatura de incubação (°C) (equação: $3,57-0,0053*x+0,33*y$); (c) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de temperatura de incubação (°C) e tempo de incubação (h) (equação: $25,73+0,33*x-0,31*y$). 69

Figura 35. Perfil para predição de valores e desejabilidade (“Profiles for predicted values and desirability”) do primeiro planejamento experimental para o melaço de cana-de-açúcar. 71

Figura 36. (a) Superfícies de resposta para a biomassa (mg/mL) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e tempo de incubação (h) (equação: $7,32+0,072*x-0,0015*x^2-0,025*y+0,00072*y^2-5,83$); (b) Superfícies de resposta para a biomassa (mg/mL) ao redor dos valores ótimos de temperatura de incubação (°C) e tempo de incubação (h) (equação: $7,32-0,18*x+0,0012*x^2-0,025*y+0,00072*y^2+0,75$); (c) Superfícies de resposta para a biomassa (mg/mL) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e temperatura de incubação (°C) (equação: $7,32+0,072*x-0,0015*x^2-0,18*y+0,0012*y^2-0,096$). 73

Figura 37. Superfícies de resposta para: (a) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e tempo de incubação (h) (equação: $544,83-7,40*x-0,028*x^2+3,01*y-0,083*y^2-354,12$); (b) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e temperatura de incubação (°C) (equação: $544,83-7,40*x-0,028*x^2-18,01*y+0,22*y^2+15,33$); (c) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de tempo de

<i>incubação (h) e temperatura de incubação (°C) (equação: $544,83-18,01*y+2,18*y^2+3,01*x-0,083*x^2-117,34$).....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 38. Superfícies de resposta para: (a) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e temperatura de incubação (°C) (equação: $317,71+3,52*x-0,082*x^2-11,50*y+0,13*y^2-77,04$); (b) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e tempo de incubação (h) (equação: $317,71+3,52*x-0,082*x^2-3,52*y+0,032*y^2-250,19$); (c) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de temperatura de incubação (°C) e tempo de incubação (h) (equação: $317,71-11,50*x+0,13*x^2-3,51*y+0,031*y^2+34,39$).....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 39. Curva de calibração para determinação da biomassa.</i>	<i>90</i>
<i>Figura 40. Curva de calibração para determinação de poli-hidroxibutirato (PHB) pelo método de Law e Slepecky (1961).</i>	<i>91</i>
<i>Figura 41. Curva de calibração para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi (1952) e Nelson (1944).</i>	<i>92</i>
<i>Figura 42. Curva de calibração para determinação de açúcares totais pelo método descrito por Dubois e colaboradores (1956).....</i>	<i>93</i>
<i>Figura 43. Relação entre o crescimento bacteriano e a produção de PHB com o tempo de incubação.</i>	<i>94</i>
<i>Figura 44. Comparação entre duas metodologias de extração do PHB intracelular, com os respectivos valores médios e desvio padrão.</i>	<i>95</i>

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1. Apresentação de diversos tipos de plástico (siglas à esquerda, de origem inglesa)</i>	17
<i>Tabela 2. Variáveis independentes estudadas no primeiro planejamento experimental 2^{6-2}</i>	35
<i>Tabela 3. Variáveis independentes estudadas no segundo planejamento experimental 3^{3-0} para a sacarose</i>	35
<i>Tabela 4. Variáveis independentes estudadas no segundo planejamento experimental 3^{3-0} para a glicose</i>	35
<i>Tabela 5. Variáveis independentes estudadas no segundo planejamento experimental 3^{3-0} para o melaço de cana-de-açúcar</i>	35
<i>Tabela 6. Planejamento experimental fatorial fracionado 2^{6-2} com duas repetições no ponto central para a sacarose utilizado no estudo da biomassa, PHB e alginato com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ($\rho < 0,05$)</i>	44
<i>Tabela 7. Valores de Pureza do PHB para o primeiro experimento com a sacarose (2^{6-2})</i>	47
<i>Tabela 8. Valores de Pureza do PHB para o segundo experimento com a sacarose (3^{3-0})</i>	51
<i>Tabela 9. Planejamento experimental fatorial fracionado 2^{6-2} (com duas repetições no ponto central) para a glicose, utilizado no estudo da biomassa, PHB e alginato com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ($\rho < 0,05$)</i>	53
<i>Tabela 10. Valores de Pureza do PHB para o primeiro experimento com a glicose (2^{6-2})</i>	57
<i>Tabela 11. Planejamento experimental fatorial completo 3^{3-0} com três repetições no ponto central para a glicose utilizado no estudo da biomassa, PHB e alginato com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ($\rho < 0,05$)</i>	60
<i>Tabela 12. Valores de Pureza do PHB para o segundo experimento com a glicose (3^{3-0})</i>	64
<i>Tabela 13. Planejamento experimental fatorial fracionado 2^{6-2} (com duas repetições no ponto central) para o melaço de cana-de-açúcar, utilizado no estudo da biomassa, PHB e alginato com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ($\rho < 0,05$)</i>	66

<i>Tabela 14. Valores de Pureza do PHB para o primeiro experimento com o melaço de cana-de-açúcar (2^{6-2}).....</i>	<i>70</i>
<i>Tabela 15. Planejamento experimental fatorial completo 3^{3-0} com duas repetições no ponto central para o melaço de cana-de-açúcar utilizado no estudo da biomassa, PHB e alginato com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ($\rho < 0,05$)</i>	<i>72</i>
<i>Tabela 16. Valores de Pureza do PHB para o segundo experimento com o melaço de cana-de-açúcar (3^{3-0}).....</i>	<i>76</i>
<i>Tabela 17. Resultados da análise de açúcares redutores, açúcares redutores e totais e, rendimento da biomassa, PHB e alginato com relação ao substrato utilizado para o segundo planejamento experimental (3^{3-0}) com a sacarose.....</i>	<i>96</i>
<i>Tabela 18. Resultados da análise de açúcares redutores, açúcares redutores e totais e, rendimento da biomassa, PHB e alginato com relação ao substrato utilizado para o segundo planejamento experimental (3^{3-0}) com a glicose</i>	<i>98</i>
<i>Tabela 19. Resultados da análise de açúcares redutores, açúcares redutores e totais e, rendimento da biomassa, PHB e alginato com relação ao substrato utilizado para o segundo planejamento experimental (3^{3-0}) com o melaço de cana-de-açúcar</i>	<i>99</i>
<i>Tabela 20. Planejamento experimental fatorial completo 3^{3-0} para a sacarose, utilizado no estudo da biomassa, PHB e alginato com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ($\rho < 0,05$)</i>	<i>100</i>

SILVA, A. N. Produção otimizada de alginato e plástico biodegradável (poli-hidroxibutirato) por *Azotobacter vinelandii*. São José do Rio Preto, 2009. 119 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Campus de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

O alginato é um polissacarídeo normalmente extraído de paredes celulares de algas marrons utilizado nas indústrias de alimentos, farmacêuticas e biotecnológicas. A produção é concentrada no cultivo de algas marinhas marrons, mas várias bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Azotobacter* produzem alginato. A estrutura química dos alginatos produzidos por algas é similar aos sintetizados pela *A. vinelandii*. Esta bactéria também produz polímeros intracelulares como o poli-hidroxibutirato (PHB), conhecido como bioplástico. Neste trabalho estudou-se a produção simultânea do alginato e PHB pela *A. vinelandii* utilizando sacarose, glicose e melão de cana-de-açúcar como fontes de carbono, além de diferentes parâmetros de fermentação em agitador orbital rotatório. Os valores ótimos para a produção destes compostos foram determinados pela metodologia de superfície de resposta (MSR). O 1º experimento realizado para as três fontes de carbono foi um planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} (variáveis independentes: concentração da fonte de carbono; concentração de acetato de amônio; concentração de citrato de amônio e ferro (III); pH; temperatura de incubação e tempo de incubação). O 2º experimento baseou-se nos valores ótimos de produção de PHB para cada fonte de carbono e resultou em um planejamento fatorial completo 3^{3-0} (variáveis independentes: concentração da fonte de carbono; temperatura de incubação e tempo de incubação). Verificou-se que a maior produtividade de PHB (100 mg/g de célula/h) utilizando o melão de cana-de-açúcar ocorreu no tempo de incubação de aproximadamente 10 h, a 60,0°C e nas concentrações de sólidos solúveis entre 14,0 - 25,0%. A glicose apresentou uma maior produtividade de PHB (60 mg/g de célula/h) no tempo de incubação de aproximadamente 10 h, entre 23,0-26,0°C e concentração de glicose entre 48,0 e 62,0 g/L. Já a sacarose, apresentou uma maior produtividade de PHB (45 mg/g de célula/h) no tempo de incubação de aproximadamente 18 h, a 60,0°C e concentração de sacarose de 10,0 g/L. Para a produtividade do alginato observou-se que, utilizando a glicose, a produtividade foi mais expressiva (6000 mg/g de célula/h) no tempo de incubação de aproximadamente 10 h, na temperatura de 25,0°C e na concentração de glicose entre 70,0 - 72,0 g/L. Já para a sacarose, a

produtividade do alginato (1600 mg/g de célula/h) foi maior no tempo de incubação de aproximadamente 18 h, entre 60,0 - 62,0 °C e na concentração de 10,0 g/L. Por fim, a maior produtividade utilizando o melaço de cana-de-açúcar (250 mg/g de célula/h) ocorreu no tempo de incubação de 10 h, a 60,0°C e na concentração de sólidos solúveis entre 4,0 - 6,0%. A pureza do PHB foi entre 93,0 - 97,5%. Dessa forma, a glicose mostrou-se como a fonte de carbono mais promissora para a produção do alginato e o melaço de cana-de-açúcar para a produção do PHB.

Palavras-chave: alginato, poli-hidroxibutirato, *Azotobacter vinelandii*, fermentação.

SILVA, A. N. Optimized production of Alginate and biodegradable plastics (polyhydroxybutyrate) by *Azotobacter vinelandii*. São José do Rio Preto, 2009. 119 p. Dissertation (Master Degree in Engineering and Food Science) – Institute of Biosciences, Letters and Exact Science, Campus of São José do Rio Preto, UNESP – São Paulo State University.

ABSTRACT

The alginate is a polysaccharide extracted from cell walls of brown seaweed used in the industries of food, pharmaceutical and biotechnology. The production is concentrated in the brown seaweed cultivation, but several bacteria, *Pseudomonas* and *Azotobacter* genus, produce alginate. The chemical structure of alginate produced by algae is similar to those synthesized by *A. vinelandii*. This bacterium also produces intracellular polymers such as polyhydroxybutyrate (PHB), known as bioplastic. In this work the simultaneous alginate and PHB production by *A. vinelandii* using sucrose, glucose and sugar cane molasses as carbon source, and different fermentation parameters in orbital shaker was studied. The optimum values for the production of these compounds were determined by the response surface methodology (RSM). The 1st experiment conducted for the three carbon sources was a fractionated factorial design 2^{6-2} (independent variables: the carbon source concentration; ammonium acetate concentration; ammonium citrate and iron (III) concentration; pH; temperature and incubation time). The 2nd experiment was based on optimum values for the production of PHB for each carbon source and resulted in a full factorial design 3^{3-0} (independent variables: the carbon source concentration; temperature and incubation time). The highest PHB yield (100 mg/g cell/h) using sugar cane molasses as a carbon source was found in 10 h at 60.0 °C and solids soluble concentrations between 14.0 and 25.0%. The glucose showed the highest PHB yield (60 mg/g cell/h) in approximately 10 h, at temperature between 23.0 – 26.0 °C and glucose concentration between 48.0 and 62.0 g/L. The sucrose, showed the highest PHB yield (45 mg/g cell/h) in approximately 18 h, 60.0 °C and sucrose concentration of 10.0 g/L. For the alginate productivity using the glucose was observed that the yield was more expressive (6000 mg/g cell/h) in approximately 10 h, incubation time, at 25.0 °C and the glucose concentration between 70.0 to 72.0 g/L. For the sucrose, the alginate productivity (1600 mg/g cell/h) was higher in approximately 18 h incubation time, at temperature ranging from 60.0 to 62.0 °C and the concentration of 10.0 g/L. Finally, the increased productivity using sugar cane molasses (250 mg/g cell/h) occurred in 10 h, at 60.0

°C and soluble solids concentration between 4.0 and 6.0%. The PHB purity was between 93.0 – 97.5%. Thus, glucose proved to be the most promising carbon source for the alginate production and sugar cane molasses for the PHB production.

Keywords: alginate, polyhydroxybutyrate, *Azotobacter vinelandii*, fermentation.

1. INTRODUÇÃO

O alginato é um polissacarídeo normalmente extraído das paredes celulares de algas marrons (*Phaeophyta*), onde se encontra como componente estrutural da parede celular e nos espaços intracelulares, promovendo rigidez e ao mesmo tempo flexibilidade à parede celular e compreende cerca de 40% da matéria seca destes organismos.

Anualmente, a indústria produz cerca de 30 mil toneladas de alginato, cujas algas são cultivadas em fazendas marinhas; sendo que o alginato extraído é utilizado como agente estabilizante, espessante e gelificante na indústria de alimentos e também para imobilizar células na indústria farmacêutica e biotecnológica.

Atualmente a produção é concentrada, principalmente, no cultivo de algas marinhas marrons, entretanto várias bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e *Azotobacter* produzem alginato e a estrutura dos blocos de resíduos dos monômeros é similar no alginato produzido por algas marinhas e o sintetizado por *A. vinelandii*. Em contraste, o alginato de *Pseudomonas* embora possua monômeros G, não possui seqüências destes monômeros, ou seja, não forma blocos G.

Devido a propriedade do ácido algínico ser insolúvel em água à temperatura ambiente, os sais de sódio, cálcio e potássio deste ácido, solúveis em água, são preferidos para serem empregados na indústria de alimentos. O composto mais amplamente usado é o alginato de sódio, o qual se torna insolúvel por meio da adição de cátions divalentes, geralmente cálcio, resultando em géis ou filmes, sendo a força do gel dependente da natureza do cátion divalente.

Com a diversidade de aplicações deste polímero nos setores alimentício e farmacêutico e a constante poluição dos mares, uma vez que as algas necessitam de água límpida para seu crescimento, a comunidade científica engajou-se em uma pesquisa continuada visando entender melhor as vias bioquímicas, a função fisiológica e a biologia das bactérias produtoras deste polímero, visando a regulação da sua formação e composição, e ainda a otimização do processo de produção. A bactéria *Azotobacter vinelandii* se mostrou mais promissora para a produção de alginato por não ser patogênica e produzir elevadas quantidades deste polímero.

A *Azotobacter vinelandii* além de produzir o alginato apresenta outra característica importante: sob limitação de nutrientes como fósforo, oxigênio e na presença de excesso de uma fonte de carbono, esta bactéria produz poli-hidroxialcanoatos (PHAs), polímeros intracelulares pertencentes à família dos poliésteres. Os PHAs podem ser sintetizados por muitas bactérias em biorreatores a partir de açúcares em condições de estresse. Estes

polímeros podem representar até 80% da massa seca total da célula. São polímeros 100% biodegradáveis e biocompatíveis.

Os PHAs também são conhecidos como bioplásticos, pois possuem propriedades termoplásticas e características de desempenho semelhantes às dos plásticos convencionais, entretanto, os bioplásticos são facilmente degradados pela ação de microrganismos no meio ambiente. São exemplos de PHAs: poli-hidroxibutirato (PHB), poli- β -hidroxivalerato (PHV) e o poli-hidroxibutirato-co-valerato (PHB-V).

Muitos microrganismos são produtores de PHAs e destes a espécie *Azotobacter vinelandii* é uma bactéria que pode acumular grandes quantidades de PHB com a vantagem de utilizar durante seu crescimento uma ampla variedade de açúcares não necessariamente refinados, como os encontrados em melão de cana-de-açúcar, beterraba e xarope de milho.

Tendo em vista a importância mundial do alginato e do poli-hidroxibutirato este trabalho mostra o estudo da produção de ambos os compostos pela bactéria *Azotobacter vinelandii* utilizando fermentação submersa com diferentes parâmetros (pH, temperatura de incubação, tempo de incubação, diferentes concentrações de sais e também diferentes concentrações de sacarose, glicose e melão de cana-de-açúcar como fonte de carbono) e a avaliação da produção pela Metodologia de Superfície de Resposta utilizada como instrumento estatístico.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Obter o poli-hidroxibutirato e o alginato utilizando a bactéria *Azotobacter vinelandii* CCT 2841 = DSM 85 a partir da otimização dos parâmetros de fermentação, usando um meio mínimo ou basal e diferentes substratos (sacarose, glicose e melaço de cana-de-açúcar) como fonte de carbono.

2.2. ESPECÍFICOS

- Otimizar a produção do poli-hidroxibutirato e alginato a partir da bactéria *Azotobacter vinelandii* utilizando um meio mínimo ou basal e diferentes substratos como fonte de carbono (sacarose, glicose e melaço de cana-de-açúcar), por meio do estudo de parâmetros de fermentação ótimos como: concentração da fonte de carbono, pH, temperatura de incubação, concentração de sais (acetato de amônio e citrato de amônio e ferro (III)) e tempo de incubação em agitador orbital rotatório.
- Determinar uma região de experimentação ou delineamento experimental para maximizar a produção do poli-hidroxibutirato e alginato utilizando os planejamentos estatísticos fatorial fracionado (2^{k-p}) e completo (3^{k-0}), descrito por Montgomery (2001), com o auxílio do software Statistica 6.0.
- Realizar, após os experimentos, a análise estatística dos dados com o modelo da análise de variância (ANOVA) e também com gráficos de contorno da metodologia de superfície de resposta (MSR), de modo a determinar os parâmetros de fermentação ótimos para a produção de poli-hidroxibutirato e alginato.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. A BACTÉRIA *Azotobacter vinelandii*

A família Azotobacteriaceae compreende as bactérias do gênero *Azotobacter*, as quais são eubactérias Gram-negativas que possuem uma parede celular complexa constituída de uma membrana externa e uma capa interna de peptidoglicano que contêm ácido murâmico e mureína. Essas bactérias se reproduzem por fissão binária, vivem em solos e em águas frescas, possuem células ovóides e grandes com diâmetro de 1,5 a 2,0 μm . Também podem apresentar como características o pleomorfismo, variando sua morfologia desde bacilos até células em forma de cocos (ALLMAN *et al.*, 1990; GARCÍA *et al.*, 2002).

As bactérias do gênero *Azotobacter* são quimio-organotróficas, utilizam açúcares, alcoóis e sais inorgânicos para crescerem. Em vida livre, fixam em média 10 mg de nitrogênio por grama de carboidrato (glicose) consumido e para esta atividade requerem molibdênio que pode ser parcialmente substituído por vanádio. Como fontes de nitrogênio podem utilizar nitrato, sais de amônio e certos aminoácidos. O pH ótimo de crescimento quando fixam nitrogênio é de 7,0-7,5. A *Azotobacter vinelandii* é poliplóide, cuja reprodução depende do meio de cultura e das condições de cultivo utilizadas, assim como da fase de crescimento em que o microrganismo se encontra (ALLMAN *et al.*, 1990). As funções biológicas que se atribuem ao PHB presente na *A. vinelandii* são várias, sendo a principal a de constituir um material de reserva de carbono e energia para a célula bacteriana, que pode ser utilizado em períodos de limitação de nutrientes no meio. Estes polímeros armazenam grandes quantidades de carbono que permanecem condensados em forma de grânulos intracelulares insolúveis sem afetar a pressão osmótica interna da célula (PAGE e KNOSP, 1989).

Outra das funções que se atribuem ao PHB na *A. vinelandii* está relacionada com a fixação biológica de nitrogênio, especificamente com a proteção da nitrogenase, garantindo a função respiratória da bactéria em ausência de uma fonte de carbono exógena ao privar a célula de uma fonte de energia e carbono rapidamente oxidável. Desse modo, permite-se manter uma taxa respiratória adequada evitando diminuir a concentração de oxigênio contribuindo, assim, à proteção desta enzima (PAGE; MANCHAK; RUDY, 1992; ALMEIDA *et al.*, 2004).

A vantagem desta espécie é a produção do PHB durante seu crescimento, por meio da utilização de uma ampla variedade de açúcares não necessariamente refinados como os

encontrados em melaço de cana-de-açúcar, beterraba e xarope de milho, por exemplo. Outra vantagem é a fácil obtenção desta bactéria, uma vez que *A. vinelandii* é encontrada em solos e também em água doce (PAGE; MANCHAK; RUDY, 1992).

3.2. ALGINATO

3.2.1. Alginato de algas

As algas marrons (*Phaeophyceae*) que contêm alginato constituem-se em uma família diversificada de plantas e crescem em praias rochosas ou nas áreas do oceano com fundo límpido e rochoso. Algumas espécies são encontradas ao nível da maré alta; outras ocorrem em um cinturão ao longo da praia, a profundidade menor que 38 metros (o limite para a penetração da luz solar). Somente algumas espécies de algas marrons são utilizadas como fonte comercial de alginatos. A alga gigante *Macrocystis pyrifera*, que cresce abundantemente nas costas da América do Norte e do Sul, Nova Zelândia, Austrália e África, é a principal fonte de suprimento mundial de alginato. Também são utilizadas variedades de *Laminaria*, *Ecklonia* e *Aschophyllum nodosum*, as quais são também colhidas por alguns produtores. Essas diferentes espécies de algas marrons produzem alginatos com diferentes proporções de ácido poligulurônico na estrutura, resultando assim em diferentes propriedades e funcionalidades destes compostos (GLICKSMAN, 1987).

O formaldeído é usualmente adicionado à alga marrom, pós-colheita, para evitar o crescimento microbiano durante sua estocagem e para fixar os polifenóis nas algas antes da extração do alginato. Sabendo que o formaldeído é tóxico, alergênico e possivelmente carcinogênico, a adição de sal na *Aschophyllum nodosum* (*Phaeophyceae*) foi testada como alternativa por Moen e colaboradores (1999). As algas foram colhidas na costa da Noruega, onde a salinidade é de aproximadamente 30‰ do final do outono até o começo da primavera, e estocadas a 22 ± 2°C sob determinadas condições. Caso as amostras de algas sejam estocadas sem tratamento, ocorre a perda de suas qualidades, assim como do material para produção do alginato em até 14 dias. Os tratamentos com formaldeído (2% peso/peso) ou com 20% NaCl preservam as algas por até 46 dias, embora a técnica com NaCl seja menos agressiva, ainda é inconveniente e onerosa para a indústria do alginato, pois é necessário o controle de temperatura, pH, oxigênio, assim como do sal; fazendo com que o método mais utilizado comercialmente seja o de adição de formaldeído (MOEN *et al.*, 1999).

3.2.2. Alginato bacteriano

A estrutura do ácido algínico consiste de cadeias lineares de resíduos de ácido β -D-manurônico (M) unidos por ligações tipo (1 \rightarrow 4) e resíduos de seu epímero, o ácido α -L-gulurônico (G), em várias proporções. Estes resíduos estão arranjados na forma de blocos de ácidos manurônico (M) ou gulurônico (G), ligados de forma que a seqüência destes resíduos na molécula seja alternada. A molécula deste polímero é constituída por blocos homopoliméricos, M- e G-, e por blocos heteropoliméricos MG- (Figura 1).

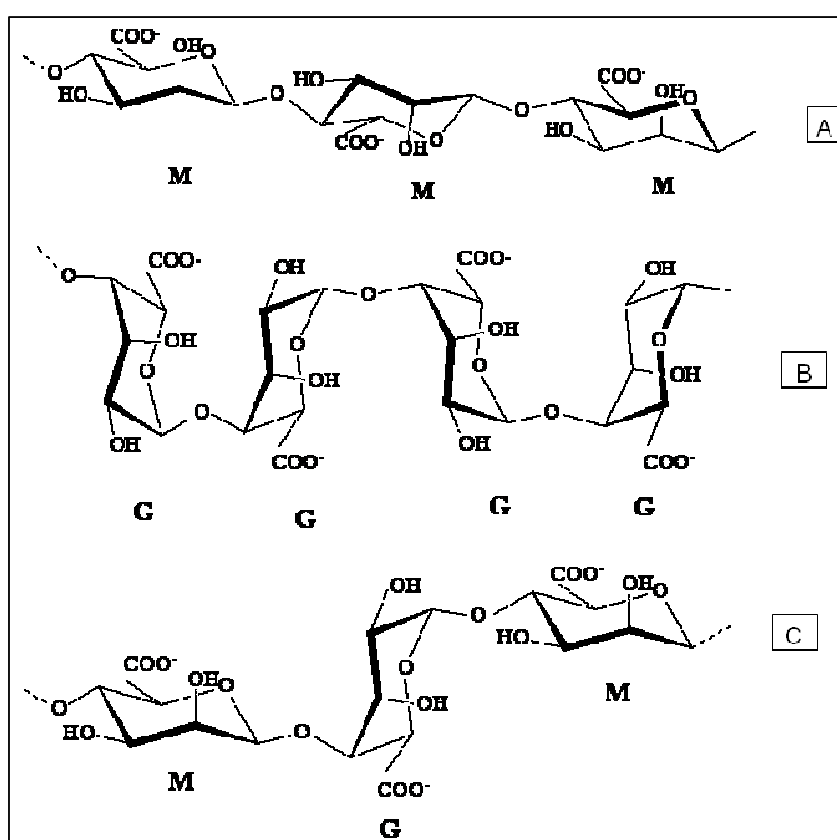


Figura 1. Estrutura dos blocos homopoliméricos M- e G-, e dos blocos heteropoliméricos MG-, que constituem a molécula de alginato. Na parte superior da figura (A) tem-se uma seqüência M-M; no centro (B) uma seqüência G-G e na parte inferior da figura (C) uma seqüência M-G-M. Adaptado de Smidsrod (1970).

As propriedades físico-químicas dos alginatos dependem da massa molecular, da proporção dos monômeros M:G ao longo da cadeia e também do grau de acetilação. Os alginatos são produzidos por bactérias e por algas marinhas marrons, sendo os resíduos de manuronato dos alginatos bacterianos acetilados nas posições O-2 e/ou O-3.

Embora as algas marinhas sejam, normalmente, a fonte comercial de alginatos, os de origem bacteriana vêm sendo sugeridos como possíveis substitutos para os alginatos de algas. Para este fim, estudos focaram inicialmente a bactéria patogênica oportunista *Pseudomonas aeruginosa*, e depois, três espécies não-patogênicas de *Pseudomonas*, incluindo *P. mendocina*, *P. putida*, e *P. fluorescens*, e ainda, a bactéria do solo *Azotobacter vinelandii* (BRIVONESE e SUTHERLAND, 1989). A maior parte do conhecimento sobre a genética da biossíntese de alginato se origina de estudos de *Pseudomonas aeruginosa*, principalmente por causa da relevância médica desta bactéria, como um importante microrganismo patogênico oportunista para humanos, em pacientes sofrendo de fibrose cística (ALKAWASH; SOOTHILL; SCHILLER, 2006; GOVAN e HARRIS, 1986; MAY e CHAKRABARTY, 1994). Nesta, os alginatos têm papel importante como um fator de virulência. A razão para isto parece ser a formação de um biofilme de alginato, o qual facilita a colonização do pulmão (GACESA e RUSSELL, 1990).

A. vinelandii e *P. aeruginosa* produzem alginato como um polissacarídeo extracelular nas células vegetativas, enquanto que na produção de alginato por *A. vinelandii* está envolvido um processo de diferenciação levando ao assim chamado “cisto” (SADOFF, 1975). Este cisto é formado pelo acúmulo intracelular de poli-hidroxibutirato delimitado dentro do citoplasma por uma membrana lipoprotéica de parede dupla, quando a célula bacteriana se encontra num meio onde, em geral, há excesso de uma fonte de carbono e limitação de nitrogênio, fósforo ou oxigênio. Quando ocorre a exaustão da fonte de carbono, estes cistos oxidam de maneira rápida (por meio da ativação da enzima PHB depolimerase) e são utilizados como fontes de energia.

O potencial dos alginatos produzidos por bactérias, como polímeros industriais, é ainda um assunto controverso. Entretanto, a possibilidade de usar matérias-primas livres de variações sazonais e geográficas, e também cepas selecionadas, sob condições operacionais cuidadosamente controladas, de maneira a atender aplicações específicas em biotecnologia e biomedicina, pode ser suficiente para compensar a produção relativamente baixa, e grau de acetilação relativamente alto, dos polímeros bacterianos (CLEMENTI *et al.*, 1999).

3.2.3. Aplicações e características dos alginatos bacterianos

Os géis de alginato são capazes de formar micro-leitos e incorporar enzimas ou células vivas inteiras, e esta aplicação tem despertado interesse na indústria de alimentos, na

biotecnologia, e no setor biomédico (SMIDSROD; SKJAK-BRAEK, 1990; SABRA; ZENG; DECKWER, 2001).

Na indústria de alimentos, os alginatos são largamente utilizados como aditivos com a capacidade de aumentar a viscosidade, estabilizar, emulsificar e gelificar soluções aquosas. A principal aplicação é na produção de sorvete, na qual é utilizado para prevenir a cristalização e o encolhimento, originando um produto homogêneo. Outra aplicação é em molhos para saladas, onde o alginato de sódio ou o éster de alginato de propileno glicol (PGA) são usados como estabilizantes para evitar a separação de fases; com a mesma finalidade é aplicado em maioneses para estabilizar as emulsões fase água/óleo. Devido ao seu conteúdo calórico baixo (1,4 Kcal/g), estes polímeros podem ser usados como “agente de corpo” na formulação de produtos de baixa caloria, como maioneses e massas (CLEMENTI, 1997).

Os alginatos são muito empregados na área de análogos de frutas ou produtos tipo imitação. Em 1946, Peschardt patenteou um processo para fazer cerejas artificiais utilizando uma solução colorida e aromatizada de alginato em açúcar, que era adicionada em forma de gotas a uma solução coagulante de sais solúveis de cálcio. Uma película de alginato de cálcio insolúvel formava-se imediatamente em volta da superfície das gotas. Após mergulhá-las em uma solução de sais de cálcio, os íons penetravam por difusão em seu interior para fazer a gelificação. Vários tipos de texturas podiam ser obtidos através do controle adequado do tipo de sal de cálcio, concentração, tempo e temperatura, etc. Estas cerejas fabricadas não eram afetadas pelo calor e podiam ser perfeitamente usadas em produtos de panificação. Além disso, tinham a vantagem de apresentar uniformidade no tamanho, peso e qualidade. Foram desenvolvidos produtos similares utilizando purês de cereja em um sistema de gelificação de alginato, comercializados com o nome de “bolas moldadas de cereja”. Outros produtos tipo imitação encontrados comercialmente são: imitação de fatias de pimentão para recheios de azeitonas, imitação de anéis de cebola, imitações de caviar, carne, pescados, produtos marinhos, etc. (*apud* GLICKSMAN, 1987).

3.2.4. Biossíntese do alginato

O alginato apresenta um papel biológico essencial na *Azotobacter vinelandii*, pois quando a célula vegetativa torna-se cistos maduros as camadas de exina e de intina apresentam 32 e 13% do peso seco em alginato, respectivamente. As variedades mutantes

desta bactéria não produzem alginato e são incapazes de formar cistos maduros. O acúmulo de alginato extracelular age como uma barreira na difusão de oxigênio ou de metais pesados ou como proteção contra outras agressões ambientais (SEGURA; CRUZ; ESPIN, 2003).

Na bactéria *A. vinelandii* o alginato é sintetizado a partir de frutose-6-P, que é convertida pela fosfo-manose-isomerase (PMI) em manose-6-P; esta, por sua vez, torna-se manose-1-P pela ação da enzima fosfo-mano-mutase (PMM). O próximo passo é a ativação da manose-1-P pela GDP-manose-pirofosforilase (GPMP) resultando na formação do GDP-manose, que é oxidado a ácido GDP-manurônico pela enzima GDP-manose-desidrogenase (GMD). O ácido GDP-manurônico é o substrato que se polimeriza na membrana interna para formar ácido polimanurônico. No periplasma alguns dos resíduos manurônicos do ácido polimanurônico são acetilados pela acetilase. O polímero é excretado para o exterior da célula onde alguns resíduos manurônicos não acetilados são epimerizados a resíduos gulurônicos por múltiplas epimerases extracelulares resultando no alginato (Figura 2).

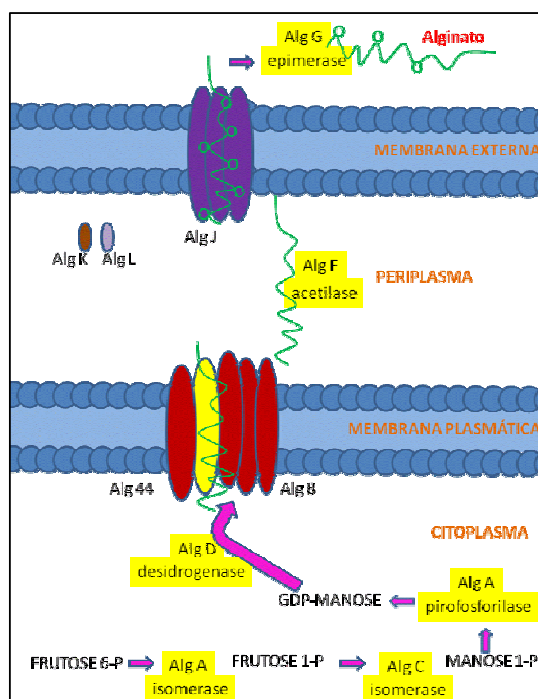


Figura 2. Rota simplificada da biossíntese de alginato pela *Azotobacter vinelandii* (adaptado de TRUJILLO-ROLDAN et al., 2003).

Os genes que codificam as enzimas envolvidas na síntese, modificação e excreção de alginato, foram identificados na *A. vinelandii*. Todos os genes estruturais estão agrupados no cromossomo e são transcritos a partir de vários promotores, exceto o gene *algC* que codifica a enzima fosfo-mano-mutase. O gene *algD*, que codifica a GDP-manose desidrogenase (DMA) é transcrito a partir de três promotores. Os genes *alg8*, *alg44*, *algK* e *algJ* que se localizam

abaixo do *algD* estão organizados em uma unidade de transcrição e seus produtos participam da polimerização e excreção do alginato, o produto do *alg8* é uma glicosil transferase, a qual tem sido proposta como responsável pela atividade da polimerase; o *alg44* codifica uma outra proteína da membrana interna, a qual é responsável por uma parte do complexo de polimerização e também transporta o polímero ao periplasma; o *algJ* codifica uma proteína da membrana externa e apresenta atividade no canal iônico que é essencial para a excreção do alginato e o produto do gene *algK* é uma proteína periplásmica que pode participar na incorporação do AlgJ na membrana externa. O gene *algG* codifica uma epimerase e o *algL* a enzima alginase. Os genes *algX*, *algV*, *algI* e *algF* são responsáveis pela acetilação dos resíduos manurônicos no periplasma e como produto do gene *algA* forma-se a enzima bifuncional que catalisa a primeira e terceira etapa da biossíntese (Figura 3) (GAONA *et al.*, 2004; STEIGEDAL *et al.*, 2008).

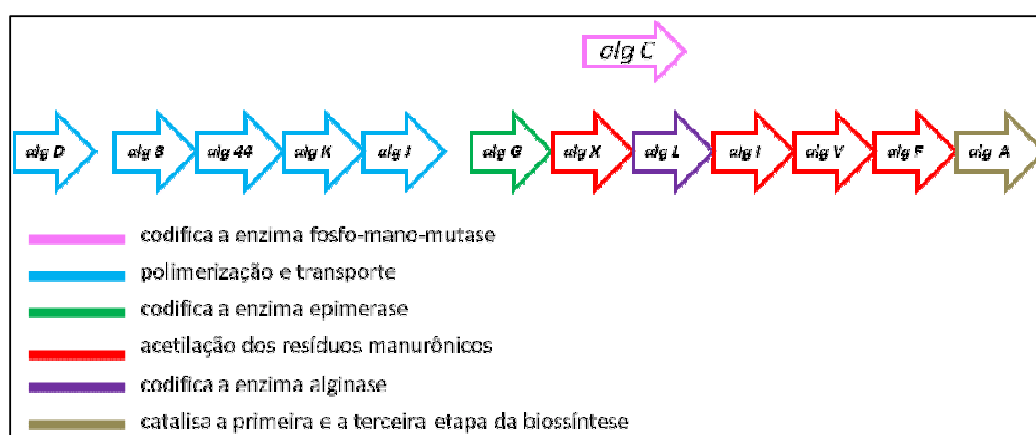


Figura 3. Genes envolvidos na biossíntese de alginato pela *Azotobacter vinelandii*.

3.2.5. Produção de alginato bacteriano

Horan, Jarman e Dawes (1983) notaram que quando um mutante de *Azotobacter vinelandii* era cultivado em cultura contínua, a quantidade de polissacarídeo produzida dependia da concentração de oxigênio dissolvido e também da fonte de carbono: sacarose suportava a síntese de alginato em meio com limitação de fosfato, enquanto que o sorbitol não suportava. Mudanças na atividade específica de enzimas-chave na biossíntese de alginato (fosfomanose isomerase e GDP-manose pirofosforilase), medidas em extratos de células desenvolvidas dentro de uma faixa de valores de concentração de oxigênio dissolvido eram refletidas pelas mudanças observadas na produção de alginato, enquanto que a atividade de

GDP-manose desidrogenase permanecia inalterada. Uma correlação similar entre as atividades específicas destas enzimas e a taxa de produção de alginato foi observada neste estudo durante a transição de sorbitol para sacarose como única fonte de carbono, mas a atividade da GDP-manose desidrogenase também aumentou com o aumento da produção de alginato. Após o prolongado cultivo contínuo em sacarose a mutante perdeu a habilidade de produzir alginato. As enzimas-chave na biossíntese de alginato não foram detectadas em extratos desta cepa não produtora de alginato, a qual também havia perdido a habilidade de formar cisto. Estes resultados suportam a opinião de que a formação de alginato é controlada pela indução de enzimas-chave na biossíntese de alginato, bem como que o alginato tem um importante papel na formação de cistos pelas bactérias (HORAN; JARMAN; DAWES, 1983).

Alguns fatores que influenciam na produção de ácido algínico por *Azotobacter vinelandii* foram investigados, em cultura por batelada, por Brivonese e Sutherland (1989). Foi observado que as maiores produções de alginato (6,0 – 7,5 mg mL⁻¹ sobrenadante) ocorreram em meio rico em nitrogênio e fosfato, tendo a glicose como fonte de carbono, aerando-se o meio com agitação a 280 rpm. A importância do oxigênio ficou evidente quando, a 120 rpm, a produção de alginato caiu para 1,4 mg mL⁻¹. A 120 rpm o acúmulo intracelular de ácido poli-hidroxibutírico (um polímero cujo acúmulo intracelular é associado com a limitação de oxigênio) foi de 40% contra 30% a 280 rpm. A presença de fosfato inorgânico foi considerada importante, pois o crescimento em meios com baixo teor de sais resultou em produção pobre de alginato, a qual não foi melhorada pela adição de fontes de nitrogênio, como o nitrato e o glutamato. A substituição da glicose por sacarose também reduziu a produção de alginato.

Em estudo semelhante, Savalgi e Savalgi (1992) verificaram que as maiores quantidades de ácido algínico produzidas por *Azotobacter vinelandii* NCIB 9068 (5,5 – 6,2 mg mL⁻¹ sobrenadante), em frascos agitados, foram obtidas quando o crescimento foi conduzido em um meio rico em nitrogênio com limitação de fosfato, tendo a sacarose como fonte de carbono, sob agitação a 240 rpm. Também observaram a redução na produção de alginato para 1,6 mg mL⁻¹, com a diminuição da agitação (140 rpm). Em contraste com Brivonese e Sutherland (1989), a substituição da sacarose por glicose reduziu o crescimento bem como a produção de alginato.

Os autores Peña, Campos e Galindo (1997) obtiveram uma maior concentração de alginato sob baixas condições de aeração (frascos Erlenmeyers convencionais). Este fenômeno pode estar relacionado com a sensibilidade ao oxigênio apresentada por algumas enzimas envolvidas na biossíntese do alginato por *A. vinelandii*. Os resultados estão de acordo

com aqueles observados por Chen e colaboradores (1985), que indicaram que a concentração de alginato era maior a 170 rpm (para valores de rpm entre 110 e 200) para uma cultura de *A. vinelandii* conduzida em frascos agitados. Um aumento da velocidade de agitação (i.e. maior aeração) era desfavorável para a produção de alginato.

A viscosidade do caldo de cultura foi maior quando sob menor aeração, sugerindo um efeito importante do oxigênio nas características moleculares (i.e. massa molecular) do polímero. Sabe-se que a viscosidade de soluções de alginato foi bastante influenciada pela distribuição da massa molecular, mas não tanto, pelo conteúdo e distribuição dos dois monômeros da molécula de alginato (MARTINSEN *et al.*, 1991). Entretanto, não há dados anteriores publicados sobre a viscosidade do caldo de cultura sob diferentes condições de cultivo. Peña, Campos e Galindo (1997) observaram que o grau de acetilação do alginato produzido por *A. vinelandii* era independente das condições de aeração.

Clementi e colaboradores (1995) observaram que a taxa de síntese de alginato cai rapidamente a zero como resultado de uma queda drástica no pH numa cultura de *A. vinelandii*. Entretanto, no estudo de Peña, Campos e Galindo (1997), a taxa de formação de alginato não foi afetada pela queda de pH experimentada na fase estacionária de crescimento.

3.3. PLÁSTICOS








O crescimento da população humana levou à acumulação de enormes quantidades de resíduos de materiais não-degradáveis em todo o nosso planeta. A acumulação de materiais plásticos tornou-se uma grande preocupação em termos de meio ambiente. Os plásticos convencionais, de origem petroquímica, demoram décadas para serem decompostos na natureza e, além disso, produzem toxinas durante o processo de degradação. Por esse motivo, há um interesse especial na produção de plásticos a partir de matérias que podem ser facilmente eliminados do nosso ambiente (SURIYAMONGKOL *et al.*, 2007; FRANCHETTI e MARCONATO, 2006).

O mundo consome atualmente cerca de 140 milhões de toneladas de plástico por ano. A produção destes materiais plásticos utiliza cerca de 150 milhões de toneladas de combustíveis fósseis. Todos os materiais baseados em carbono (por exemplo: plásticos, espumas, revestimento e adesivos) apresentam as suas propriedades físicas e químicas devido à longa cadeia carbono-carbono. Os plásticos mais utilizados na vida diária, desde 1940, têm sido o polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), poli(tereftalato de etileno) (PET) e o poli(cloreto de vinila) (PVC) (Tabela 1). O desafio para o mundo é substituir as

fontes não-renováveis destes materiais com longas cadeias de carbono por uma fonte renovável (SURIYAMONGKOL *et al.*, 2007; FRANCHETTI e MARCONATO, 2006).

Os plásticos, quando incinerados ou queimados, emitem várias substâncias tóxicas, incluindo cancerígenas tais como as dioxinas. A reciclagem de plásticos em grande escala apresenta diversos obstáculos tais como: a grande diversidade de plásticos criando uma dificuldade na separação dos mesmos, sistemas de coleta seletiva de lixo ineficiente, além de falta de incentivos fiscais aos empresários deste setor. Além disso, alguns plásticos não podem ser reciclados para a sua utilização original.

Tabela 1. Apresentação de diversos tipos de plástico (siglas à esquerda, de origem inglesa)

Símbolo	Plástico
 PETE	Tereftalato de polietileno (TPE) - Plástico transparente, usado em garrafas, frascos. O tereftalato de polietileno é utilizado em 25% das garrafas de plástico produzidas. Pode ser reciclado em fibra de vidro utilizadas em roupas de inverno, pranchas de surf, etc.
 HDPE	Polietileno de alta densidade (PEAD) - Utilizado na manufatura de recipientes para detergentes, leite, garrafas de óleo, sacos e outros recipientes. O polietileno de alta densidade é usado em mais de 50 % das garrafas produzidas. Podem ser reciclados em garrafas de detergente, canos de drenagem, contentores de reciclagem, mesas, caixas de correio e cercas.
 V	Vinil (V) ou Cloreto de polivinila (PVC) - Plásticos especialmente resistentes; as formas rígidas de PVC são utilizadas em canos e a forma flexível é empregada em tecidos de vinil. Podem ser reciclados em cercas, canos etc.
 LPPE	Polietileno de baixa densidade (PEBD) - Plástico utilizado habitualmente na produção de celofane. Também utilizado na produção de sacos para pão, lixo, etc. Pode ser reciclado e acima de tudo reutilizado em sacos de lixo e sacolas de compras.
 PP	Polipropileno (PP) - Plástico bastante leve usado habitualmente no empacotamento de comida (margarina, iogurte, etc.), revestimentos entre diversos usos possíveis. Podem ser reciclados e reutilizados em alimentadores de aves e baldes de água.
 OS	Poliestireno (PE) - Polímero conhecido como Estirofoam, sendo bastante utilizado em embalagens, como isolante em frigoríficos, copo de café, utensílios de plástico, etc. Pode ser reciclado em interruptores, termômetros, etc.
	Outros- Plásticos diferentes dos outros 6 ou mistura dos anteriores. A mistura de diferentes plásticos pode ser reciclada num plástico relativamente duro, utilizado em equipamento de exteriores, tais como mesas, cadeiras e material náutico.

O interesse pelo bioplástico encontra-se em expansão no mundo todo. Apesar disto, o alto custo de sua produção ainda é uma grande desvantagem em relação aos polímeros convencionais, basta comparar o custo de produção do poli(hidroxibutirato) (PHB) estimado a US\$ 2,65/kg para uma planta de 100.000 t/ano, utilizando sacarose como substrato, com o valor do polipropileno US\$1,00/kg. Outras estimativas preliminares apresentam um custo de produção de US\$5,85/kg para uma planta de 30.000t/ano. O custo dos poli(hidroxialcanoatos) (PHAs) utilizando a *Alcaligenes eutrophus* é de US\$16/kg, isto é 18 vezes mais que o polipropileno. Com a *E. coli* o preço pode ser reduzido a US\$4/kg, um custo semelhante a materiais plásticos biodegradáveis, tais como o poli(ácido lático) (PLA) e a poli(ϵ -caprolactona) (PCL). A produção de PHB demanda 3 kg de sacarose/kg final de produto, sendo que o preço do açúcar representa 29% do custo final (sem considerar taxas), portanto, o custo médio de produção do PHB varia em função do tipo de açúcar empregado, do preço do açúcar, do microrganismo utilizado e da planta de produção (FRANCHETTI e MARCONATO, 2006).

3.3.1. Plásticos convencionais

O petróleo é um recurso mineral formado por uma grande mistura de compostos. A partir do seu refino são extraídos diversos produtos como gasolina, diesel, querosene, gás de cozinha, óleo combustível, lubrificantes, parafina e compostos químicos que são matérias-primas para as indústrias de tintas, ceras, vernizes, resinas, extração de óleos e gorduras vegetais, pneus, borrachas, fósforos, chicletes, filmes fotográficos e fertilizantes.

O plástico é um material cada vez mais dominante em nossa sociedade e o encontramos frequentemente em nosso dia-a-dia. Entretanto, a sua decomposição por microrganismos é um processo lento, podendo se estender por centenas de anos.

3.3.2. Bioplásticos ou plásticos biodegradáveis

Os plásticos biodegradáveis são degradados por microrganismos quando descartados em solo e aterros. Essa degradação resulta primariamente da ação de microrganismos, tais como fungos, bactérias e algas de ocorrência natural, gerando CO₂, CH₄, componentes celulares e outros produtos, segundo estabelecido pela “American Standard for Testing and Methods” (ASTM-D-833). De outro modo, os plásticos biodegradáveis são materiais que se

degradam em dióxido de carbono, água e biomassa, como resultado da ação de organismos vivos ou enzimas (FRANCHETTI e MARCONATO, 2006; SURIYAMONGKOL *et al.*, 2007; VAN-THUOC *et al.*, 2008).

Os PHAs são polímeros intracelulares que podem ser sintetizados por muitas bactérias em biorreatores a partir de açúcares em condições de crescimento caracterizadas por excesso de uma fonte de carbono e limitação de outros nutrientes como nitrogênio e fósforo (FRANCHETTI e MARCONATO, 2006; ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; SUZUKI *et al.*, 2008). Embora muitos microrganismos tenham a capacidade de acumular este polímero, um número limitado é considerado como bons candidatos à produção industrial de PHB. Entre eles, *Cupriavidus necator* (anteriormente chamado *Ralstonia eutropha*), *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* e a recombinante *Escherichia coli* têm demonstrado os mais elevados acúmulos de poliéster (cerca de 70-90% da massa celular seca). O microrganismo *Cupriavidus necator* requer limitação de nutrientes durante a fermentação para, então, produzir PHB. Este microrganismo acumula mais PHB durante a fase estacionária de crescimento. As outras três bactérias não requerem limitação de nutrientes para iniciar a síntese de PHB, apesar da limitação de um nutriente no meio de cultura favorecer um maior acúmulo deste polímero no interior das células. Em alguns desses casos, essas fontes complexas de nitrogênio como extrato de levedura ou peptona de peixe podem ser utilizadas para reforçar o crescimento da célula e, por sua vez, a produtividade volumétrica (QUILLAGUAMÁN *et al.*, 2008).

Estudos realizados anteriormente mostraram que enterobactérias não acumulavam PHAs naturalmente, sendo necessária a introdução de genes clonados. Entretanto, Lugg e colaboradores (2008) estudaram uma enterobactéria de ocorrência natural, a *Serratia* sp., e observaram que esta era capaz de acumular PHB (aproximadamente 50% do peso celular seco) em meio contendo excesso de uma fonte de carbono e deficiência em nitrogênio.

Existe uma grande diversidade estrutural dos PHAs, sendo que pelo menos 90 monômeros diferentes foram identificados como constituintes de sua estrutura molecular. Estes monômeros incluem: quase todos os 3-hidroxicanoatos (3HAs) contendo de 3 a 16 átomos de carbono; 3-hidroxicanoatos contendo uma ou duas insaturações; 3HAs com grupos metila em várias posições; outros hidroxicanoatos com os grupos hidroxila nas posições 4, 5 ou 6; 3HAs contendo carboxi livres, carboxi esterificados a alquilas ou ácido benzóico, fenoxi ou acetoxi, para-cianofenoxi ou para-nitrofenoxi, hidroxilas secundárias, epoxi, ciano ou átomos como flúor, cloro ou bromo ligados ao carbono terminal do monômero (GOMEZ; BUENO-NETTO, 2001; MISRA *et al.*, 2007) (Figura 4).

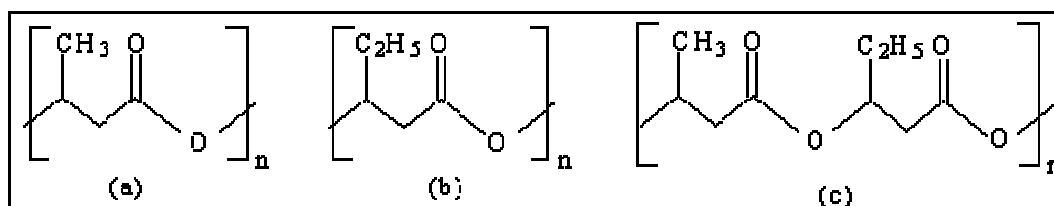


Figura 4. Estrutura química dos poli-hidroxicanoatos (PHAs): a) poli-hidroxibutirato; b) poli-hidroxivalerato e, c) poli-hidroxibutirato-co-valerato.

A síntese e incorporação desses diferentes monômeros dependem do fornecimento de um substrato adequado que possa ser convertido no hidroxiacil-CoA desejado por meio de reações metabólicas existentes na célula bacteriana. Além disso, é necessário que a célula bacteriana contenha uma enzima denominada PHA sintase, que seja capaz de incorporar a hidroxiacil-CoA sintetizada a uma cadeia polimérica (GOMEZ; BUENO-NETTO, 2001).

3.4. POLI-HIDROXIALCANOATOS

A presença de inclusões no citoplasma, parecidas com inclusões de lipídeos, as quais eram solúveis em clorofórmio foram inicialmente observadas na *Azotobacter chroococcum* por volta de 1900. A composição química de inclusões similares encontradas na bactéria *Bacillus megaterium* foi identificada em 1926, como o ácido poli-3-hidroxibutírico (P(3HB)), por Lemoigne. No final dos anos 50, estudos realizados com o gênero *Bacillus* sugeriram que o P(3HB) apresentava a função de reserva intracelular de carbono e energia para esta bactéria. Em 1974, Wallen e Rohwedder identificaram outros hidroxicanoatos além do 3HB, extraídos do lodo ativado. Um interessante trabalho também foi realizado por Witholt e colaboradores, em 1983, quando cultivaram *Pseudomonas oleovorans* em n-octano. Uma análise elementar do polímero intracelular mostrou que esta bactéria acumulou principalmente 3-hidroxiocetanoato e pequenas quantidades de 3-hidroxiexanoato (*apud* SUDESH; ABE; DOI, 2000, p.: 1504).

O copolímero P(3HB-co-3HV) foi produzido comercialmente pela empresa ZENECA Bioproducts, na Inglaterra, a partir de glicose e ácido propiônico, empregando-se uma linhagem mutante de *Ralstonia eutropha*. O poliéster obtido deste processo foi lançado no mercado, com o nome de BIOPOL (BYROM, 1992). O BIOPOL é utilizado desde 1990 na Alemanha na produção de frascos de xampu para a indústria de cosméticos Wella

(BRAUNEGG; LEFEBVRE; GENSER, 1998). Outros produtos como aparelhos de barbear descartáveis, também feitos de BIOPOL, foram testados no Japão. Copos feitos de PHA puro ou de papel revestido internamente com um filme de BIOPOL, como impermeabilizante, já foram usados. As misturas de PHA com plásticos convencionais, como polipropileno, também foram testadas e atualmente a empresa Monsanto (USA) possui o direito de patente deste produto (BYROM, 1992).

3.4.1. Características dos poli-hidroxicanoatos

O PHB possui propriedades similares ao polipropileno com três características únicas: processabilidade termoplástica, 100% de resistência à água e 100% de biodegradabilidade (HRABAK, 1992). Booma, Selke e Giacín (1994) estabeleceram que o PHB é um homopolímero alifático com ponto de fusão a 179°C e altamente cristalino (80%). O peso molecular do PHB decresce aproximadamente pela metade do valor original quando este é mantido a 190°C por 1 hora. Os PHAs possuem propriedades físicas que vão desde quebradiços e termicamente instáveis até macios e resistentes, dependendo de sua composição. As propriedades físicas do PHB, por exemplo, cristalização e alta força de tensão dependem do peso molecular, o qual é influenciado pela espécie de microrganismo empregada, condições de crescimento e pureza das amostras obtidas (PUNRATTANASIN, 2001; HEO *et al.*, 2008).

3.4.2. Aplicações dos poli-hidroxicanoatos

3.4.2.1. Aplicações médicas e farmacêuticas

Uma norma internacional ISO 10993-3 (1982) estabelece os requisitos específicos para a biocompatibilidade, incluindo os testes com base na natureza do contato e do tempo de permanência do biomaterial implantado. A norma determina que todos os materiais que permanecerão em contato com mucosas, ossos ou tecidos dentários, na qual o contato exceder 30 dias, assim como todos os dispositivos implantáveis em que o contato ultrapasse 24 h, devem ser submetidos a testes de genotoxicidade. Baseado nas recomendações padrões das normas ISO 10993-3 (1982) e a ASTM (1987), muitos métodos de ensaio são realizados para

a determinação de atividades mutagênicas e genotóxicas do implante. Estes incluem testes de toxicidade, mutagênese, aberrações cromossômicas, etc. (ALI *et al.*, 2008).

Embora o produto de degradação do P(3HB), o D(-)-3-ácido hidroxibutírico seja um composto metabólico intermediário de muitos organismos (LAFFERTY; KORSATKO; KORSATKO, 1988; LEE, 1996), Ali e colaboradores (2008) realizaram o estudo de mutagenicidade do poli-hidroxibutirato utilizando o teste *Salmonella*/microsomo e verificaram que o PHB não é genotóxico e não altera expressão do proto-oncogenes e do gene anti-apoptótico considerados no estudo. Desse modo, é plausível que haja biocompatibilidade do tecido animal com o P(3HB), podendo assim ser implantado em seus tecidos sem alguma toxicidade.

Algumas possíveis aplicações de PHAs incluem: carregadores biodegradáveis que apresentam a função de liberarem drogas por um determinado tempo dentro do corpo do indivíduo, agulhas cirúrgicas, fios de suturas, reposição do tecido ósseo, etc. A vantagem do uso de plásticos biodegradáveis é que não necessitam de remoção cirúrgica (PUNRATTANASIN, 2001).

Outra vantagem em utilizar o PHB em sistemas de administração de medicamentos é que a concentração da droga no sangue do doente e/ou tecidos pode ser mantida em um nível desejado por um longo tempo. O requisito principal para a fabricação de medicamentos com um sistema de liberação e ação prolongada é a disponibilidade de um material capsular adequado, que deve ser absolutamente inócuo para o organismo e de possuir as propriedades físico-mecânicas e biomédicas necessárias, incluindo sua degradação no meio biológico. Ao contrário de outros materiais que são amplamente utilizados em administração controlada de medicamentos, tais como a gelatina, proteínas, etc., os PHAs estão disponíveis na forma quimicamente pura e sua velocidade de degradação no meio é baixa quando comparada com os compostos citados acima, fato que é muito importante em tratamentos prolongados. Através da variação da estrutura química do PHAs ou de sua mistura com diferentes materiais, pode-se controlar a porosidade e a velocidade de degradação da matriz polimérica e, conseqüentemente, a taxa de liberação da droga. Atualmente, os carregadores biodegradáveis são utilizados para transportarem antidepressivos, contraceptivos, antineoplásicos e antiinflamatórios (SHISHATSKAYA *et al.*, 2008; SUZUKI *et al.*, 2008).

3.4.2.2. Aplicações na agricultura

Os PHAs são biodegradáveis no solo e podem ser utilizados como carregadores para liberarem inseticidas, herbicidas ou fertilizantes por um determinado tempo no solo; como containeres e embalagens; como matriz biodegradável para liberação de drogas na medicina veterinária; etc. (ARAÚJO, 2005).

3.4.2.3. Aplicações em produtos de uso geral

As possíveis aplicações dos PHAs incluem filmes plásticos, sacolas, containeres, barbeadores, utensílios domésticos e uma variedade de produtos encontrados em nosso cotidiano (ARAÚJO, 2005).

3.4.3. Biossíntese do poli-hidroxibutirato

A produção do PHB na bactéria *A. vinelandii* envolve três enzimas. No início do processo ocorre a condensação de duas moléculas de acetil-CoA pela enzima β -cetotiolase para gerar acetoacetil-CoA, a qual é reduzida pela acetoacetil-CoA redutase utilizando NADPH produzindo D(-)- β -hidroxibutiril-CoA, que é finalmente polimerizada pela PHB sintase resultando no PHB (SEGURA; CRUZ; ESPIN, 2003) (Figura 5).

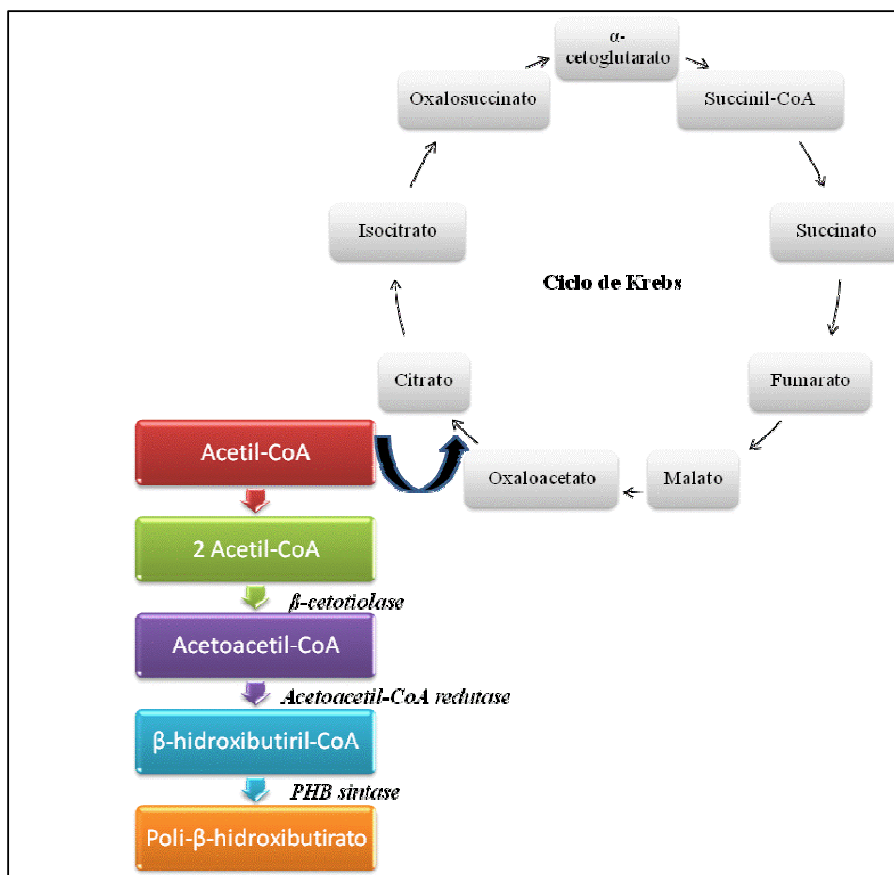


Figura 5. Biossíntese do PHB e ciclo de Krebs na bactéria *Azotobacter vinelandii*.

Em geral, as bactérias produtoras de PHB apresentam o acúmulo deste polímero em resposta a uma interferência em seu crescimento, principalmente devido à falta de nutrientes como nitrogênio, fósforo, magnésio e oxigênio, e na presença de excesso de uma fonte de carbono (BURNS *et al.*, 2007).

O ponto de controle importante é a atividade da enzima β -cetotiolase. Esta enzima é ativada quando a concentração de acetil-CoA é elevada, uma situação que resulta do acúmulo de NADH ou NADPH em resposta a baixa concentração de oxigênio no meio. Com estes metabólitos ocorre a inibição das enzimas (citrato sintase e isocitrato desidrogenase) do ciclo de Krebs reduzindo o fluxo de carbono para este ciclo e levando a um aumento da concentração de acetil-CoA, fato que estimula a atividade da β -cetotiolase. Estas condições também favorecem a atividade da enzima (acetoacetil-CoA redutase) que catalisa a segunda etapa do processo (PAGE; MANCHAK; RUDY, 1992).

Muitos pesquisadores têm identificado os genes estruturais responsáveis pela síntese de PHB na *A. vinelandii*. Observou-se que o gene *phbA* codifica a β -cetotiolase e os genes

phbB e phbC codificam a segunda e terceira enzima, respectivamente, da etapa de biossíntese do PHB (SEGURA; CRUZ; ESPIN, 2003) (Figura 6).

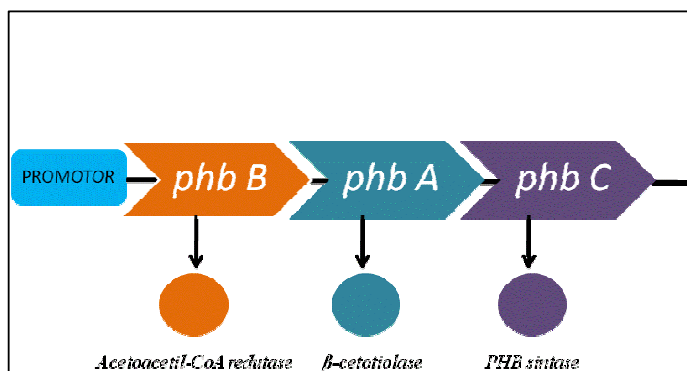


Figura 6. Genes envolvidos na biossíntese de PHB pela *Azotobacter vinelandii*.

Durante o ciclo de vida da bactéria *A. vinelandii* pode ocorrer a formação de cistos resistentes à dessecação após crescimento exponencial, embora essas condições sejam observadas em menos de 0,1% da população celular. A formação de cistos também pode ser induzida por reagentes específicos como n-butanol ou β -hidroxibutirato (LIN e SADOFF, 1968).

As células vegetativas móveis, em grande tamanho e com forma oval, quando transferidas para um meio sólido, sem nitrogênio e com 0,2% de β -hidroxibutirato formam cistos. No trabalho apresentado por Segura, Cruz e Espin (2003), foi relatado que quatro horas após a incubação neste meio, essas células perderam os seus flagelos e sofreram uma última divisão celular dando origem à duas células completamente redondas e muito encapsuladas, cujo recobrimento era formado pelo exopolissacarídeo alginato. Após 30 horas formou-se a exina (camada exterior) em torno do cisto maduro. Posteriormente, ocorreu a formação da intina (estrutura que se localiza no espaço entre a exina e membrana celular externa). O ponto chave destes eventos foi a formação de um cisto maduro, consistindo de uma célula pequena e redonda, além de uma parede celular delgada de ácido murâmico. O centro celular estava coberto com duas camadas, a exina e a intina, compostas principalmente de lipoproteínas e alginato e, no centro da célula existiam muitos grânulos de PHB (SEGURA; CRUZ; ESPIN, 2003).

Os cistos são células metabolicamente inativas sendo consideravelmente mais resistentes às condições adversas ou deletérias quando comparados as células vegetativas. No

laboratório são viáveis por mais de 10 anos, quando mantidas em solo seco, sugerindo que a resistência à dessecação lhes permita sobreviver em tais condições, em natureza.

A etapa de germinação ocorre quando os cistos metabolicamente inativos sofrem as alterações necessárias para se tornarem células vegetativas. Isso ocorre quando os cistos são incubados em meio contendo sais minerais, sem nitrogênio, em condições aeróbicas e na presença de uma fonte de carbono como glicose ou sacarose (SEGURA; CRUZ; ESPIN, 2003).

3.4.4. Produção de poli-hidroxicanoatos

A produção de PHA utilizando bactérias envolve as seguintes etapas: manutenção da cultura bacteriana em meio apropriado; pré-fermentação e/ou fermentação. Durante a pré-fermentação e fermentação, o microrganismo é cultivado em meio contendo sais minerais e uma ou mais fontes de carbono. As fontes de carbono podem ser refinadas como o açúcar sacarose e glicose ou fontes mais complexas como melão de beterraba, melão de cana-de-açúcar, soro de queijo, resíduos agroindustriais, etc. (PAGE e KNOSP, 1989).

3.4.5. Métodos de extração e determinação do PHA

Atualmente há duas metodologias comumente utilizadas na extração de PHA do interior das células. A metodologia convencional é baseada na solubilidade do polímero em clorofórmio e de sua insolubilidade em metanol. O PHA presente no clorofórmio pode ser recuperado por evaporação do solvente e precipitação por adição de metanol, etanol, etc.. A segunda metodologia foi desenvolvida para evitar o uso de solventes orgânicos. Nesta, as células bacterianas são tratadas com um coquetel de enzimas (incluindo proteases, nucleases e lisozimas) e detergentes para remover proteínas, ácidos nucleicos e paredes celulares deixando intactos os grânulos de PHA. Entretanto, a segunda metodologia pode aumentar o custo final da produção do PHA (PUNRATTANASIN, 2001; SURIYAMONGKOL *et al.*, 2007; SUZUKI *et al.*, 2008).

Outros métodos desenvolvidos empregam o hipoclorito de sódio para a digestão de materiais celulares presente na célula, entretanto o uso deste composto pode causar uma degradação severa na molécula de PHB resultando em até 50% da redução do seu peso molecular. Já o uso de hipoclorito de sódio com clorofórmio reduz significativamente esta

degradação da molécula. Neste caso, o clorofórmio dissolve imediatamente o PHB, isolando-o do hipoclorito e protegendo-o da degradação (LEE, 1996).

Os métodos utilizados na determinação do poli-hidroxibutirato incluem: a cromatografia gasosa, na qual é realizada uma metanólise do ácido-poli-hidroxibutírico sem prévia extração do PHB do interior das células (BRAUNEGG; SONNLEITNER; LAFFERTY, 1978); o outro método consiste na reação do PHB com ácido sulfúrico concentrado por meio de aquecimento obtendo como produto final o ácido crotônico, cujo composto é analisado em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 235 nm (LAW; SLEPECKY, 1961).

3.4.6. Biodegradação de poli-hidroxicanoatos

A vantagem do plástico biodegradável quando comparada com o plástico de origem petroquímica é que o tempo para degradá-lo dependerá do que foi adicionado à resina considerada biodegradável, mas a ordem de grandeza é de meses (6 a 12 meses) contra 40 a 50 anos ou até 200 anos no caso do PET.

O PHA apresenta como principal característica a sua biodegradabilidade, podendo ser biodegradado em diversos ambientes naturais como: solo, ambientes marinhos e em lagoas. Entretanto, a velocidade de biodegradação do material dependerá de vários fatores relativos ao ambiente como temperatura, nível de mistura, pH e nutrientes, além de fatores relacionados ao material biodegradável como composição, cristalinidade, à presença ou não de aditivos e à área superficial (SUDESH; ABE; DOI, 2000).

Um grande número de microrganismos como bactérias e fungos do solo, lodos, ambientes marinhos, lagoas, ar, etc., excretam enzimas PHA depolimerase que hidrolisam o PHA em oligômeros e monômeros solúveis em água, os quais são subseqüentemente utilizados como nutrientes pelas células.

Tseng e colaboradores (2007) isolaram diversas linhagens de actinomicetos termófilos de diversos ambientes de Taiwan e utilizaram em ensaios para degradação de poli(etileno succinato) (PES), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e / ou de poli(β -hidroxibutirato) (PHB) por meio do teste da zona clara. Dentre as 341 estirpes de actinomicetos termófilos, 105 degradaram o PHB (30,8%), 198 eram decompositores de PCL (58,1%) e 99 degradaram o PES (29,0%). Além disso, 77 degradaram tanto o PHB e como o PCL (22,6%), 35 isolados degradaram o PHB e o PES (10,3%), 81 isolados degradaram o PES e o PCL (23,8%) e 31 degradaram os três poliésteres usados neste estudo (9,1%). Com base na morfologia e características

químicas, estas 31 estirpes pertenciam aos gêneros *Actinomadura* (12,9%), *Microbispora* (25,8%), *Streptomyces* (48,4%), *Thermoactinomyces* (9,7%) e *Saccharomonospora* (3,22%).

Tokiwa e Calabia (2007) estudaram a degradação microbiana do filme de PHB utilizando a bactéria isolada do solo *Pseudomonas* cepa SC-17. As observações em microscopia eletrônica de varredura revelaram dois modos de degradação na superfície dos filmes de PHB, sendo um dos modos a degradação somente por ação da enzima e o outro pela proliferação de microrganismos sobre a superfície do filme formando buracos esféricos.

Acredita-se que a superfície do filme de PHB seja uma área ideal para o crescimento de microrganismos que degradam este composto. Normalmente, a aderência de microrganismos na superfície do material sólido ou de filmes e a posterior colonização da superfície exposta são os principais mecanismos envolvidos na degradação microbiana de polímeros sólidos.

O estudo realizado por Sudesh, Abe e Doi (2000) com o auxílio da microscopia eletrônica mostrou que a degradação do PHB ocorreu na superfície do material por meio da hidrólise enzimática. A velocidade de degradação enzimática do P(3HB) pela enzima PHB depolimerase foi fortemente dependente da concentração da enzima e este processo envolveu duas etapas: a adsorção e a hidrólise. Na primeira etapa a enzima se ligou à superfície do material e na segunda etapa ocorreu a hidrólise das cadeias poliméricas por meio do sítio ativo da enzima. Foi proposto um modelo no qual o domínio catalítico principal da enzima PHB depolimerase identifica ao menos três unidades monoméricas como substrato, sendo a velocidade de hidrólise enzimática de uma ligação éster fortemente dependente da estrutura química da segunda e da terceira unidade monomérica na cadeia do poliéster. Desse modo, o sítio catalítico se liga ao substrato por interações com o grupo carbonil na unidade hidroxil terminal R_1 para auxiliar a reação de hidrólise da segunda ligação éster com o sítio ativo do domínio catalítico. O comprimento da cadeia principal de carbono da segunda unidade monomérica R_2 deve ser limitada entre 3 a 4 átomos de carbono devido a sua facilidade de ligação com o sítio ativo da enzima. Por outro lado, a estrutura química da terceira unidade monomérica R_3 deve afetar a acessibilidade da ligação éster ao sítio ativo da enzima PHB depolimerase. Quando a terceira unidade monomérica apresenta uma cadeia lateral muito volumosa, como as unidades 3-hidroxicaproato e o 3-hidroxiexanoato, a PHB depolimerase pode apresentar dificuldade em atacar a ligação éster. Conseqüentemente, a velocidade de hidrólise da ligação éster pela PHB depolimerase decresce com o aumento do tamanho da cadeia das unidades de hidroxialcanoatos (SUDESH; ABE; DOI, 2000).

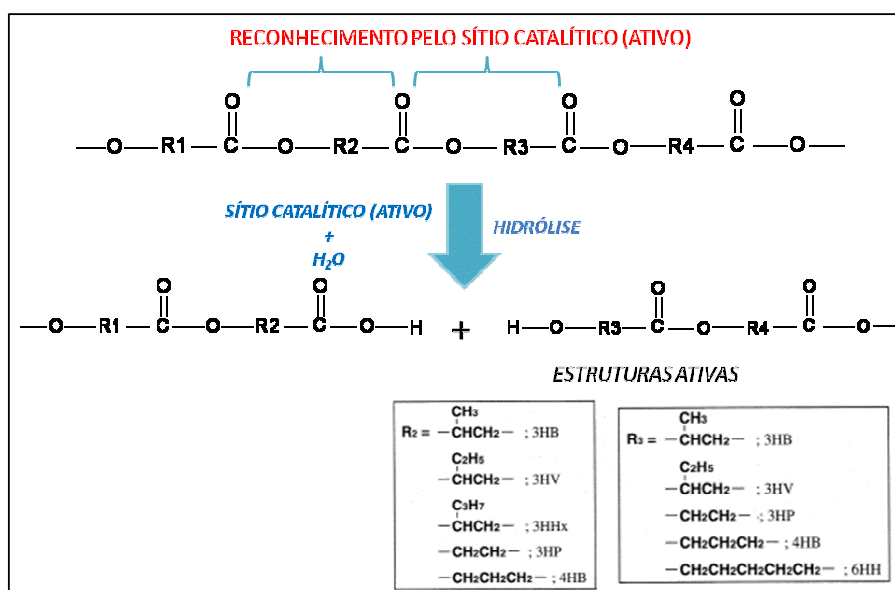


Figura 7. Reação de hidrólise enzimática da ligação éster por meio da enzima extracelular PHB depolimerase.

Os produtos finais da degradação do PHA em ambientes aeróbicos são dióxido de carbono e água, enquanto metano é produzido em condições anaeróbicas. O efeito de diferentes ambientes na velocidade de degradação do P(3HB) e P(3HB-co-3HV) tem sido estudado por diversos pesquisadores e foi mostrado que o P(3HB-co-3HV) (modelagem de 1 mm espessura) foi completamente degradado depois de 6 e 75 semanas em lodo anaeróbico e solo, respectivamente (LEE, 1996; TOKIWA E CALABIA, 2007).

O ciclo de carbono envolvendo os PHAs está ilustrado na Figura 8.

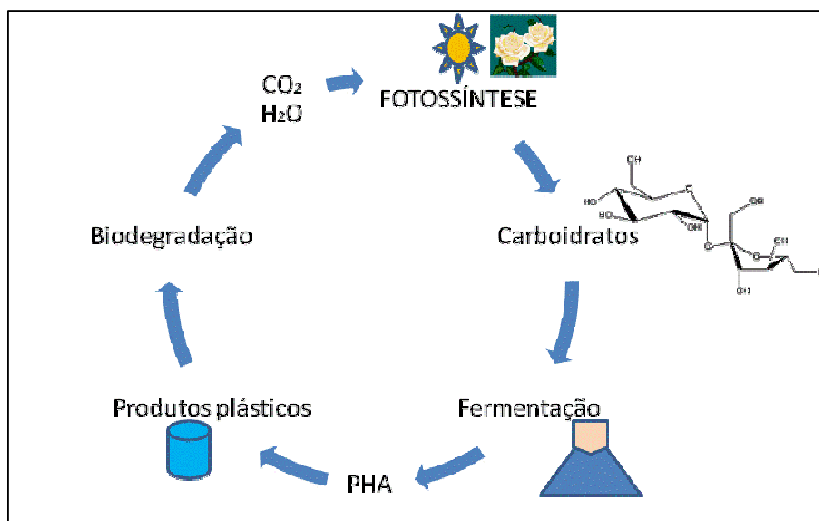


Figura 8. Ciclo de carbono dos poli-hidroxialcanoatos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado foi o *Azotobacter vinelandii* CCT 2841 = DSM 85 obtido da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello” - Campinas - SP.

4.2. MEIOS DE CULTURA

4.2.1. Meio de Manutenção

A linhagem do microrganismo *Azotobacter vinelandii* CCT 2841 = DSM 85 foi mantida em agar Yeast Medium (YM) cuja fórmula é indicada a seguir (em gramas por litro): extrato de levedura 3,0; extrato de malte 3,0; peptona 5,0; dextrose 10,0; agar 20,0 e água destilada 1,0 litro (Figura 9).



Figura 9. *Azotobacter vinelandii* CCT 2841 = DSM 85 mantida em agar YM.

4.2.2. Meio de Fermentação

Para a produção de poli-hidroxibutirato e alginato foi utilizado o meio mínimo ou basal (item 4.2.2.1) acrescentando-se diferentes substratos como fonte de carbono: sacarose, glicose e melão de cana-de-açúcar (Figura 10).



Figura 10. Frascos Erlenmeyer estéreis contendo sacarose (solução incolor) ou caldo nutriente (solução amarela).

4.2.2.1. Meio Mínimo ou Basal

O meio mínimo utilizado foi descrito por García e colaboradores (2002), sendo formado pelos seguintes componentes (em gramas por litro): KH_2PO_4 0,16; K_2HPO_4 0,64; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,4; NaCl 0,2; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,05; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0025 e $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,001. O pH foi ajustado de acordo com o planejamento experimental e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

4.2.2.2. Meio Mínimo ou Basal com sacarose

O meio mínimo foi esterilizado em autoclave separadamente das soluções de sacarose, a 121°C por 20 minutos. As soluções de sacarose nas concentrações determinadas no planejamento experimental (item 4.4.) foram misturadas na etapa de fermentação.

4.2.2.3. Meio Mínimo ou Basal com glicose

O meio mínimo foi esterilizado em autoclave separadamente das soluções de glicose, a 121°C por 20 minutos. As soluções de glicose nas concentrações determinadas no planejamento experimental (item 4.4.) foram misturadas na etapa de fermentação.

4.2.2.4. Meio Mínimo ou Basal com melaço de cana-de-açúcar

O meio mínimo foi esterilizado em autoclave separadamente das soluções de melaço de cana-de-açúcar, a 121°C por 20 minutos. O melaço de cana-de-açúcar foi diluído para 30°Brix com água destilada e posteriormente clarificado. Após resfriar e decantar por 24 h utilizou-se um refratômetro para ajustar a concentração de sólidos solúveis em 10,0; 30,0 e 50,0 g/L com água destilada estéril. Em seguida, os frascos Erlenmeyer de 250,0 mL contendo as concentrações de melaço de cana-de-açúcar desejadas foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos (Figura 11). O meio mínimo ou basal foi adicionado na etapa de fermentação.



Figura 11. Frascos Erlenmeyer estéreis contendo melaço de cana-de-açúcar e a fonte de sais (meio mínimo ou basal).

4.3. CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

4.3.1. Preparo do Pré-Inóculo

A partir da cultura estoque do *Azotobacter vinelandii* CCT 2841 = DSM 85 foram repicados, por estrias em esgotamento, tubos contendo Plate Count Agar (PCA) inclinado, os quais foram incubados em estufa a 30°C por 24 horas (Figura 12).



Figura 12. Crescimento da *Azotobacter vinelandii* CCT 2841 = DSM 85 em tubos contendo PCA inclinado.

4.3.2. Pré-Fermentação

Com o pré-inóculo obtido em 4.3.1, realizou-se a suspensão da cultura de célula bacteriana pela adição de 5,0 mL de caldo nutriente contido no frasco Erlenmeyer (o qual apresentava um total de 50,0 mL de caldo nutriente) e, em seguida, transferiu-se a suspensão para este mesmo frasco Erlenmeyer. Os frascos foram incubados em agitador orbital rotatório na temperatura de 30°C por 24h e 225 rpm (PAGE e KNOSP, 1989; PAGE *et al.*, 1992).

4.3.3. Fermentação e Produção do PHB e alginato

Em uma cubeta do espectrofotômetro (Cintra 5 UV-VIS “DoubleBeam”) (Figura 18), foram adicionados 3,0 mL do meio mínimo ou basal e gotas do meio de cultura obtido na pré-fermentação (item 4.3.2.) até atingir uma densidade ótica de 0,9 no comprimento de onda de 620 nm (PAGE e KNOSP, 1989). Através de uma regra de três, foi verificado o volume de inóculo a ser adicionado em cada frasco de Erlenmeyer contendo 50,0 mL do meio de

fermentação. Para todos os experimentos realizados, foi padronizado o inóculo inicial de *Azotobacter vinelandii* CCT 2841 = DSM 85 em 0,74 mg de peso seco/mL, correspondente à absorbância de 0,9 da suspensão a 620 nm. Logo após, os frascos Erlenmeyer foram incubados em agitador orbital rotatório a 120 rpm na temperatura e tempo de incubação pré-determinadas pelo planejamento experimental (item 4.4.) (Figura 13).

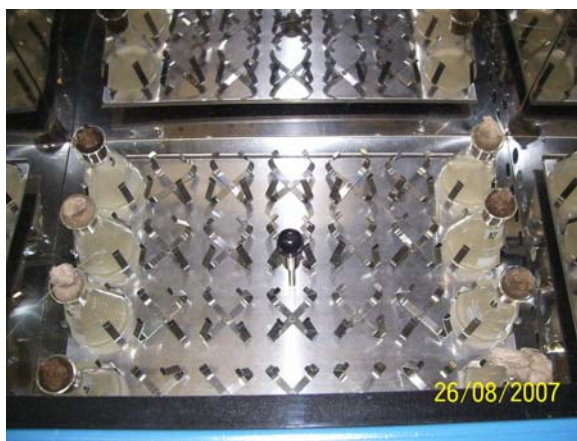


Figura 13. Frascos Erlenmeyer incubados em agitador orbital rotatório a 120 rpm na temperatura e tempo de incubação pré-determinadas pelo planejamento experimental.

4.4. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO

Para a otimização da produção do PHB (Y_1 = poli-hidroxibutirato) e do alginato (Y_2 = alginato) foram realizados dois planejamentos experimentais, de maneira a determinar a melhor área de produção de ambos os compostos. Desse modo, no primeiro delineamento experimental foi realizado um planejamento estatístico fatorial fracionado 2^{6-2} (para cada fonte de carbono) e as variáveis independentes estudadas foram: X1 = fonte de carbono em g L⁻¹ (sacarose, glicose ou melão de cana-de-açúcar); X2 = pH; X3 = temperatura de incubação em °C; X4 = acetato de amônio em mmol L⁻¹; X5 = citrato de amônio e ferro (III) em $\mu\text{mol L}^{-1}$ e X6 = tempo de incubação em horas; resultando em 16 experimentos acrescido de 2 repetições no ponto central (MONTGOMERY, 2001; GALDÁMEZ, 2002) (Tabela 2).

Tabela 2. Variáveis independentes estudadas no primeiro planejamento experimental 2^{6-2}

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
X1 – fonte de carbono (g L ⁻¹)	10,0	30,0	50,0
X2 – pH	6	7	8
X3 – temperatura de incubação (°C)	25,0	32,5	40,0
X4 – acetato de amônio (mmol L ⁻¹)	15,0	37,5	60,0
X5 – citrato de amônio e ferro (III) (μmol L ⁻¹)	30,0	60,0	90,0
X6 – tempo de incubação (h)	48	72	96

Com a perspectiva de aproximar da região ótima de produção realizou-se um segundo planejamento experimental para as fontes de carbono sacarose, glicose e melão de cana de açúcar utilizando apenas as variáveis independentes X₁ = fonte de carbono; X₃ = temperatura de incubação e X₆ = tempo de incubação, resultando em um planejamento estatístico fatorial completo 3³⁻⁰ (Tabela 3, 4 e 5).

Tabela 3. Variáveis independentes estudadas no segundo planejamento experimental 3³⁻⁰ para a sacarose

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
X1 - Fonte de Carbono (g L ⁻¹)	2,0	6,0	10,0
X2 - Temperatura de incubação (°C)	40,0	50,0	60,0
X3 - Tempo de incubação (h)	18	33	48

Tabela 4. Variáveis independentes estudadas no segundo planejamento experimental 3³⁻⁰ para a glicose

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
X1 - Fonte de Carbono (g L ⁻¹)	50,0	60,0	70,0
X2 - Temperatura de incubação (°C)	18,0	21,5	25,0
X3 - Tempo de incubação (h)	12	30	48

Tabela 5. Variáveis independentes estudadas no segundo planejamento experimental 3³⁻⁰ para o melão de cana-de-açúcar

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
X1 - Fonte de Carbono (%)	5,0	15,0	25,0
X2 - Temperatura de incubação (°C)	40,0	50,0	60,0
X3 - Tempo de incubação (h)	12	30	48

Durante o segundo experimento para a sacarose, manteve-se o pH inicial em 7 e as soluções de acetato de amônio, citrato de amônio e ferro (III) em $37,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e $57,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Já para o segundo experimento para a glicose, manteve-se o pH inicial em 8,0; acetato de amônio igual a $60,0 \text{ mmol L}^{-1}$; citrato de amônio e ferro (III) em $30,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. O segundo experimento para o melaço de cana-de-açúcar apresentou as seguintes variáveis fixas: pH inicial = 7,0; acetato de amônio = $60,0 \text{ mmol L}^{-1}$; citrato de amônio e ferro (III) = $90,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.5.1. Construção da curva de calibração para determinação da concentração celular a partir de suspensões de *Azotobacter vinelandii* CCT 2841 = DSM 85

Para a construção da curva de calibração da concentração celular foi utilizada suspensão de *Azotobacter vinelandii* CCT 2841 = DSM 85 obtida após o processo de pré-fermentação.

A metodologia foi executada da seguinte forma:

- Um volume de 50,0 mL de cultura de células de *Azotobacter vinelandii* CCT 2841 = DSM 85, obtido nas condições de pré-fermentação, foi centrifugado a $6941g$ a 4°C , durante 15 minutos, e lavado duas vezes com água destilada;
- A massa celular úmida foi ressuspensa em 50,0 mL de água destilada (suspensão original) e posteriormente foram preparadas diferentes diluições;
- Um volume de 5,0 mL de suspensão celular original e de cada diluição de suspensão de células foi colocado em cadinhos de porcelana, anteriormente secos em mufla a 550°C por 2h e pesados em balança analítica;
- Os cadinhos, contendo a suspensão celular original e as diferentes diluições, foram colocados em estufa a 90°C por 24h;
- Os cadinhos foram transferidos para um dessecador, contendo cristais de sílica, e mantidos à temperatura ambiente por 30 minutos para resfriamento;
- Os cadinhos foram pesados em balança analítica, transferidos novamente para a estufa e após 24h, novamente pesados, a fim de confirmar a constância das medições;

- Uma vez conhecidos o volume e a massa de células, esta última obtida pela subtração do peso dos cadinhos com células e do peso dos cadinhos vazios, foi determinada a concentração celular da suspensão celular original e das amostras que foram diluídas;
- Paralelamente, foram feitas leituras de absorbância a 620 nm (espectrofotômetro Cintra 5 UV-VIS “DoubleBeam”) com a amostra da suspensão celular original e com as diluídas;
- Com base nas absorbâncias das amostras diluídas e da suspensão original, construiu-se a curva de calibração, relacionando a absorbância com a concentração celular em mg mL^{-1} (Apêndice, Figura 39).

4.5.2. Determinação da biomassa

A massa celular foi determinada medindo-se no espectrofotômetro a 620 nm uma suspensão de células em água destilada, após separação das mesmas por centrifugação a 6941g, 15 minutos a 4°C (Figura 14). Previamente, foi obtida a curva de correlação de absorbância versus concentração celular (Apêndice, Figura 39). Todas as análises foram realizadas em triplicata.



Figura 14. Centrífuga (Jouan GR20.22) utilizada na separação da massa celular do caldo fermentado.

4.5.3. Processo de extração do PHB e alginato

As células foram separadas do meio fermentado por centrifugação a 6941g durante 15 minutos a 4°C.

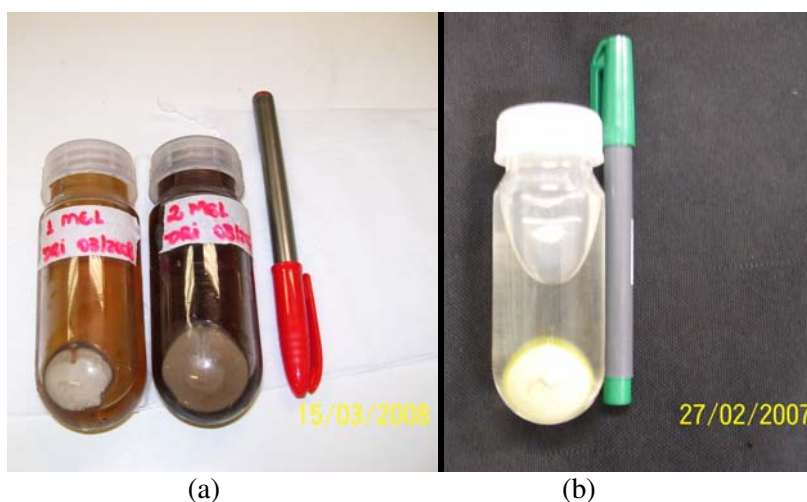


Figura 15. Células separadas do meio fermentado por centrifugação a 6941g durante 15 minutos a 4°C: (a) caldo fermentado contendo melação de cana-de-açúcar como fonte de carbono e, (b) caldo fermentado contendo sacarose como fonte de carbono.

Após esse procedimento, fez-se a retirada do PHB intracelular com clorofórmio. Para isto, utilizou-se a proporção de 100 mL de clorofórmio para cada 1-2 gramas de células e a mistura permaneceu em refluxo por 15 minutos na temperatura de 61°C. A seguir, separou-se o PHB do material celular por meio da filtração seguida de precipitação com etanol absoluto e, o precipitado foi seco em estufa à vácuo à 45°C até peso constante (PUNRATTANASIN, 2001) (Figura 16).

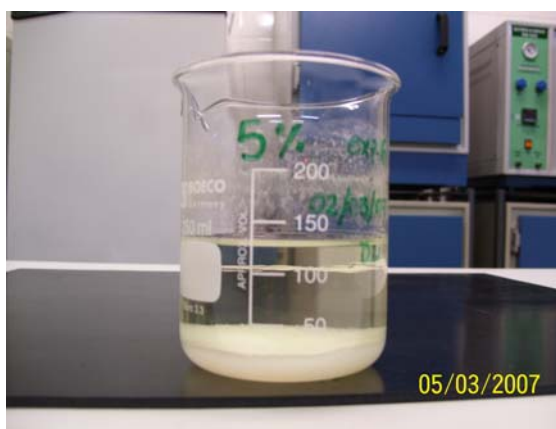


Figura 16. Precipitação do PHB com etanol absoluto.

O sobrenadante obtido na centrifugação foi utilizado para a obtenção do alginato. Desse modo, adicionou-se 3V de etanol absoluto para a precipitação do alginato, o qual foi seco em estufa à vácuo a 45°C até peso constante (Figura 17).



Figura 17. Precipitação do alginato com etanol absoluto.

4.5.4. Purificação do PHB e alginato

A purificação foi realizada dissolvendo-se o PHB em hidróxido de sódio 1 N precipitando-o novamente com etanol absoluto (LIN e SADOFF, 1968; POUTON e AKHTAR, 1996). O alginato seco foi dissolvido em água destilada e precipitado novamente com etanol absoluto. Ambos os procedimentos foram repetidos três vezes.

4.5.5. Determinação da pureza do PHB

A determinação da pureza do PHB foi realizada segundo a metodologia de Law e Slepecky (1961) baseada na reação, à quente, do polímero obtido (PHB) com ácido sulfúrico concentrado de alta pureza analítica resultando em ácido crotônico, cuja absorvância é medida no comprimento de onda de 235 nm.

Para isto, preparou-se amostras contendo de 10 a 50 μg de PHB (marca Sigma-Aldrich, com 100% de pureza) em 1 mL de clorofórmio P.A. Em seguida, o clorofórmio foi evaporado e adicionou-se 10 mL de ácido sulfúrico concentrado no tubo de ensaio, seguido de aquecimento em banho-maria a 100°C por 10 minutos. Posteriormente, resfriou-se a solução e a absorvância do ácido crotônico formado foi medida com uma cubeta de quartzo a 235 nm utilizando ácido sulfúrico como branco (LAW e SLEPECKY, 1961; VAN-THUOC *et al.*, 2008).

A curva padrão de absorvância (235nm) versus concentração do padrão de PHB ($\mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido sulfúrico) encontra-se no Apêndice, Figura 40.



Figura 18. Espectrofotômetro Cintra 5 UV-VIS “DoubleBeam” utilizado na determinação da pureza do PHB.

4.5.6. Determinação de açúcares totais e redutores

A determinação de açúcares redutores (AR) baseou-se na metodologia de Somogyi (1952) e Nelson (1944), na qual os glicídeos redutores aquecidos em meio alcalino, transformam-se em enedióis que reduzem o íon cúprico presente a cuproso. O óxido cuproso assim formado reduz a reação arsênio-molibdico a óxido de molibdênio de coloração azul, cuja intensidade de cor é proporcional a quantidade de açúcares redutores existentes na amostra. A determinação de açúcares redutores e totais (ART) foi realizada segundo a metodologia descrita por Dubois e colaboradores (1956), a qual emprega o reagente fenol-sulfúrico. As curvas de calibração para a determinação de AR e ART encontram-se no Apêndice, Figura 41 e 42, respectivamente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. TESTES PRELIMINARES

A literatura menciona diferentes tempos de incubação para a produção de alginato e PHB pela bactéria *Azotobacter vinelandii*. Portanto, foi necessário realizar um experimento para determinar o melhor tempo de incubação sob as condições do laboratório. Para isto, foi realizada a análise do crescimento celular num meio mínimo ou basal (item 4.2.2.1.) acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose em pH inicial igual a 7,5. Em seguida, este meio de fermentação foi incubado em agitador orbital rotatório a 30°C e 120 rpm. Observou-se que a maior concentração celular úmida (g L⁻¹) e a maior concentração de PHB (g L⁻¹) ocorreram no tempo de 96 h (Apêndice, Figura 43).

5.1.1. Comparação da eficiência de extração do PHB utilizando diferentes métodos

Após a determinação do melhor tempo de incubação foi necessário comparar a eficiência de extração do PHB. Desta forma, para definir qual método de extração seria utilizado durante os experimentos foram comparados dois métodos de extração do PHB: o descrito por Punrattanasin (2001) que emprega somente o clorofórmio P.A. como solvente (item 4.5.3.) e o outro descrito por Hahn, Chang e Lee (1995) o qual extrai o PHB intracelular a partir de uma dispersão de 50 mL de hipoclorito de sódio 2% e 50 mL de clorofórmio P.A. para cada 1g de célula. Este último seguiu o seguinte protocolo: as células foram colocadas em um balão de fundo chato e realizou-se um refluxo a 30°C por 1h, em seguida, a mistura permaneceu em repouso para a separação das três fases (a fase superior contendo a solução de hipoclorito de sódio, a fase mediana contendo células e material celular sem PHB e a fase inferior contendo clorofórmio e PHB). Na fase do clorofórmio contendo PHB adicionaram-se 3V etanol absoluto para a precipitação do PHB.

Ambos os testes foram realizados ao final de uma fermentação de 96h (precedida de uma pré-fermentação de 48h em meio mínimo, descrito no item 4.2.2.1., e 30 g L⁻¹ de sacarose) em agitador orbital rotatório a 30°C e 120 rpm. Os experimentos foram realizados

em triplicata para cada método de extração nas concentrações de sacarose de 30, 40 e 50 g L⁻¹ e pH 7,5, perfazendo um total de 18 experimentos.

Os resultados mostraram que a extração do PHB somente com clorofórmio foi mais eficiente que aquela obtida com a dispersão de hipoclorito de sódio 2% e clorofórmio P.A. (Apêndice, Figura 44).

Baseado nestes resultados, o método de extração mais eficiente que foi aplicado em todos os experimentos que se sucederam foi o descrito por Punrattanasin (2001), o qual emprega somente clorofórmio P.A. durante a extração.

5.1.2. Determinação de açúcares totais e redutores

O resultado da reação com os açúcares totais presentes na amostra é a formação de uma coloração castanha cuja intensidade dependerá da quantidade de açúcares totais presentes na amostra. As curvas de calibração para a determinação de AR e ART encontram-se no Apêndice, Figura 41 e 42, respectivamente.

As análises de AR e ART foram realizadas nos planejamentos experimentais para sacarose, glicose e melão de cana-de-açúcar e pode-se observar que para todos os experimentos o consumo médio de açúcar pela *A. vinelandii* foi de 88,98 % com um desvio padrão de 12,79% (Apêndice, Tabela 17, 18 e 19).

5.2. SACAROSE

5.2.1. Primeiro Planejamento Experimental

Com o estudo da Análise de Variância (ANOVA) pelo software STATISTICA 6.0 observou-se no planejamento estatístico fatorial fracionado 2⁶⁻² que, embora tenham sido analisados diferentes parâmetros (concentração da fonte de carbono (sacarose), pH, temperatura de incubação, concentração de acetato de amônio, concentração de citrato de amônio e ferro (III) e tempo de incubação), nenhum destes foram significantes estatisticamente ($\rho < 0,05$) para o aumento da biomassa (Tabela 6). Entretanto, por meio da metodologia de superfície de resposta pode-se observar que o aumento da biomassa (2,29 mg

mL^{-1}) foi acompanhado pelo acréscimo da concentração de sacarose (55 g L^{-1}) na temperatura entre $38\text{-}42^\circ\text{C}$ e tempo de incubação entre $40\text{-}50 \text{ h}$ (Figura 19). Este comportamento da biomassa em relação à fonte de carbono apresentou valores semelhantes aos obtidos por Cho e colaboradores (2001) e foi observado que quanto maior a concentração da fonte de carbono maior é o crescimento bacteriano.

O estudo do crescimento bacteriano da *Azotobacter vinelandii* com relação à variação de temperatura não havia sido registrado anteriormente nos artigos de referência, pois apenas citavam a faixa entre $25\text{-}30^\circ\text{C}$. Entretanto, a melhor temperatura para o desenvolvimento celular apresentou-se entre $38\text{-}42^\circ\text{C}$, ou seja, nas maiores temperaturas testadas. O tempo de incubação também foi um fator importante para determinar a fase do crescimento bacteriano, sendo assim, o maior valor de biomassa encontrado neste primeiro experimento foi entre $40\text{-}50 \text{ h}$ e acima deste tempo ocorreu uma diminuição da biomassa, provavelmente por se encontrar na fase de morte. Alguns autores (LIN e SADOFF, 1968; GARCIA *et al.*, 2002) também encontraram maiores valores de biomassa entre $40\text{-}50 \text{ h}$.

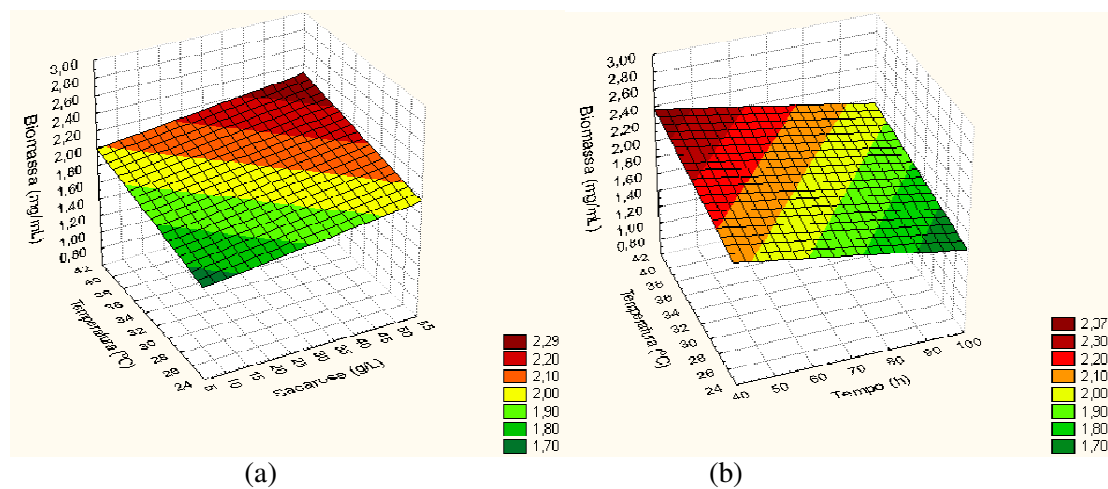


Figura 19. Superfícies de resposta para: (a) concentração de biomassa (mg mL^{-1}) ao redor dos valores ótimos de concentração de sacarose (g L^{-1}) e temperatura de incubação ($^\circ\text{C}$) (equação: $1,169+0,0061*x+0,0189*y$); (b) concentração de biomassa (mg mL^{-1}) ao redor dos valores ótimos de tempo (h) e temperatura de incubação ($^\circ\text{C}$) (equação: $1,8635-0,0071*x+0,0189*y$).

Tabela 6. Planejamento experimental fatorial fracionado 2^{6-2} com duas repetições no ponto central para a sacarose utilizado no estudo da biomassa, PHB e alginato com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ($\rho < 0,05$)

Ensaio	X1 Concentração de sacarose (g/L)	X2 pH	X3 Temperatura de incubação (°C)	X4 Acetato de amônio (mmol/L)	X5 Citrato de amônio e ferro (III) ($\mu\text{mol/L}$)	X6 Tempo de incubação (h)	Biomassa (mg/mL)	PHB (mg/g de cel/h)	Alginato (mg/g de cel/h)
							$\rho =$ nenhum	$\rho =$ X1; X3; X1*X2*X4	$\rho =$ nenhum
1	10,0	6	25	15	30	48	1,79	1,36	40,71
2	50,0	6	25	15	90	48	1,94	0,32	320,06
3	10,0	8	25	15	90	96	1,61	2,41	30,67
4	50,0	8	25	15	30	96	1,92	4,67	0,00
5	10,0	6	40	15	90	96	0,90	18,02	34,50
6	50,0	6	40	15	30	96	2,36	8,36	0,00
7	10,0	8	40	15	30	48	2,58	14,12	0,00
8	50,0	8	40	15	90	48	2,86	16,64	0,00
9	10,0	6	25	60	30	96	2,28	10,83	29,33
10	50,0	6	25	60	90	96	2,02	4,54	26,71
11	10,0	8	25	60	90	48	1,88	6,73	104,74
12	50,0	8	25	60	30	48	2,13	3,13	0,00
13	10,0	6	40	60	90	48	2,55	7,67	0,00
14	50,0	6	40	60	30	48	2,34	11,19	0,00
15	10,0	8	40	60	30	96	2,14	13,64	0,00
16	50,0	8	40	60	90	96	2,10	0,00	0,00
17*	30,0	7	32,5	37,5	60	72	0,83	10,68	151,74
18*	30,0	7	32,5	37,5	60	72	1,11	10,00	193,42

* Pontos centrais.

ρ = variável independente significativa estatisticamente ($\rho < 0,05$).

A produção de PHB teve como parâmetros significativos ($\rho < 0,05$) apenas a concentração de sacarose e a temperatura de incubação. Com a metodologia de superfície de resposta observou-se que a produtividade do PHB foi maior em temperaturas elevadas (39 - 42°C) provavelmente por ser um fator de estresse à *Azotobacter vinelandii*, levando-a a acumular uma maior quantidade desse polímero intracelular. Observou-se também que houve uma maior concentração de PHB em menores concentrações de sacarose (5 - 20 g L⁻¹), comportamento oposto ao crescimento celular. Isto pode ser explicado pelo fato da produtividade do PHB não estar relacionada com o número de células bacteriana, mas com a capacidade que cada célula apresenta em acumular este polímero (Figura 20).

Os autores Page e Cornish (1993) utilizaram um meio contendo 30 g L⁻¹ de glicose e obtiveram 14-24 g L⁻¹ de PHB entre 37-47 h de fermentação em 30°C. Page e Knosp (1989) utilizaram apenas 10 g L⁻¹ de glicose e obtiveram 2,4 g L⁻¹ de PHB em 30 h. García e colaboradores (2002) utilizaram ácido-4-hidroxibenzoico 25 mmol L⁻¹ como fonte de carbono

e obtiveram 0,10 g L⁻¹ de PHB em 120 h. Já os autores Zanzig e Scholz (2003) além de 30 g L⁻¹ de glicose utilizaram 20 g L⁻¹ de polietilenoglicol e com isso obtiveram entre 0,05-0,06 g L⁻¹ de PHB em 24 h. Entretanto, a vantagem em se utilizar a sacarose como fonte de carbono é que este açúcar é economicamente mais barato que a glicose e o Brasil é um dos maiores produtores deste açúcar, motivos pelos quais foi escolhida esta fonte de carbono.

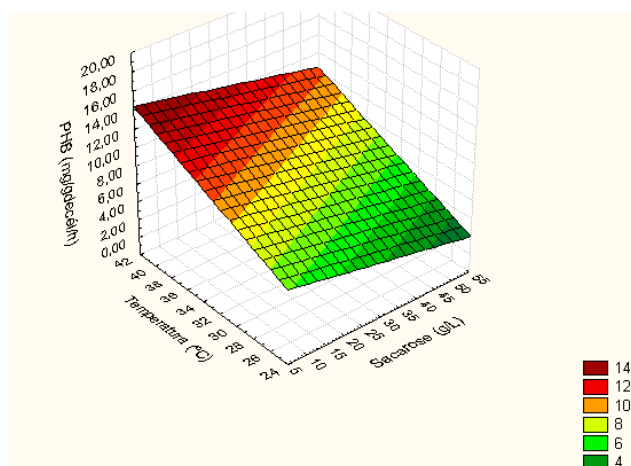


Figura 20. Superfícies de resposta para a produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos da concentração de sacarose (g L⁻¹) e temperatura de incubação (°C) (equação: $-4,62-0,081*x+0,46*y$).

O estudo da Análise de Variância (ANOVA) na produção concomitante de alginato e poli-hidroxibutirato pela bactéria *A. vinelandii* revelou que nenhuma das variáveis independentes apresentou significância estatística ($p < 0,05$) na produção do alginato. Entretanto, a metodologia de superfície de resposta indicou que a produção de alginato foi máxima (89-100 mg/g de célula/h) entre 40-55h de fermentação, temperatura de 24-28°C e sacarose na concentração de 40-55 g L⁻¹ (Figura 21). A produtividade do alginato foi maior em concentrações elevadas de sacarose, comportamento semelhante ao crescimento bacteriano indicando, portanto, que a produção de alginato depende da quantidade de biomassa.

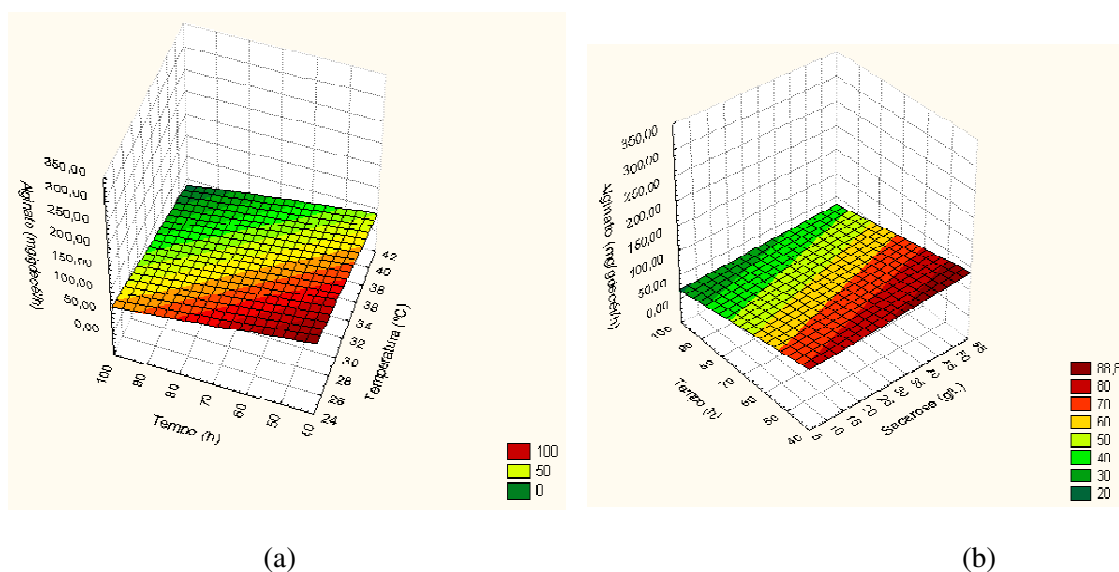


Figura 21. (a) Superfícies de resposta para a produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de temperatura (°C) e tempo de incubação (h) (equação: $256,55-4,31*x-0,8966*y$); (b) Superfícies de resposta para a produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de sacarose ($g L^{-1}$) e tempo de incubação (h) (equação: $106,31+0,3338*x-0,8966y$).

Comparando a quantidade de alginato produzida com os valores descritos na literatura pode-se observar que Horan, Jarman e Dawes (1983) obtiveram cerca de 180 mg/g de célula/h utilizando $20 g L^{-1}$ de sacarose como fonte de carbono. Brivonese e Sutherland (1989) utilizaram glicose como fonte de carbono e obtiveram entre 6 - $7,5 g L^{-1}$ de alginato a 280 rpm e observaram que diminuindo a agitação para 120 rpm a produção foi de apenas $1,4 g L^{-1}$ de alginato. Os resultados deste trabalho mostraram que a produção máxima de alginato foi de $29,8 g L^{-1}$ em 48h de incubação a 120 rpm.

A pureza do PHB foi determinada segundo a metodologia de Law e Slepecky (1961) utilizando a curva de calibração do PHB (Apêndice, Figura 40) e o PHB extraído apresentou pureza entre 93,0 e 97,5% (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de Pureza do PHB para o primeiro experimento com a sacarose (2^{6-2})

Ensaio	Concentração teste de PHB ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância 235 nm	Concentração determinada ($\mu\text{g/mL}$)	% Pureza
1	5,00	0,7059	4,74	94,7
2	5,00	0,7204	4,81	96,2
3	5,00	0,7014	4,71	94,2
4	5,00	0,7312	4,87	97,4
5	5,00	0,7026	4,72	94,4
6	5,00	0,7054	4,73	94,7
7	5,00	0,6999	4,70	94,1
8	5,00	0,6987	4,70	93,9
9	5,00	0,6899	4,65	93,0
10	5,00	0,7025	4,72	94,3
11	5,00	0,7106	4,76	95,2
12	5,00	0,7000	4,70	94,1
13	5,00	0,7011	4,71	94,2
14	5,00	0,7324	4,88	97,5
15	5,00	0,7088	4,75	95,0
16	5,00	0,7066	4,74	94,8
17	5,00	0,7063	4,74	94,8
18	5,00	0,7051	4,73	94,6

5.2.2. Segundo Planejamento Experimental

O segundo planejamento experimental para sacarose foi realizado com base nos gráficos de perfil para predição de valores e desejabilidade da produtividade do PHB (“Profiles for predicted values and desirability”) do primeiro planejamento experimental com o auxílio do software Statistica 6.0 (Figura 22).

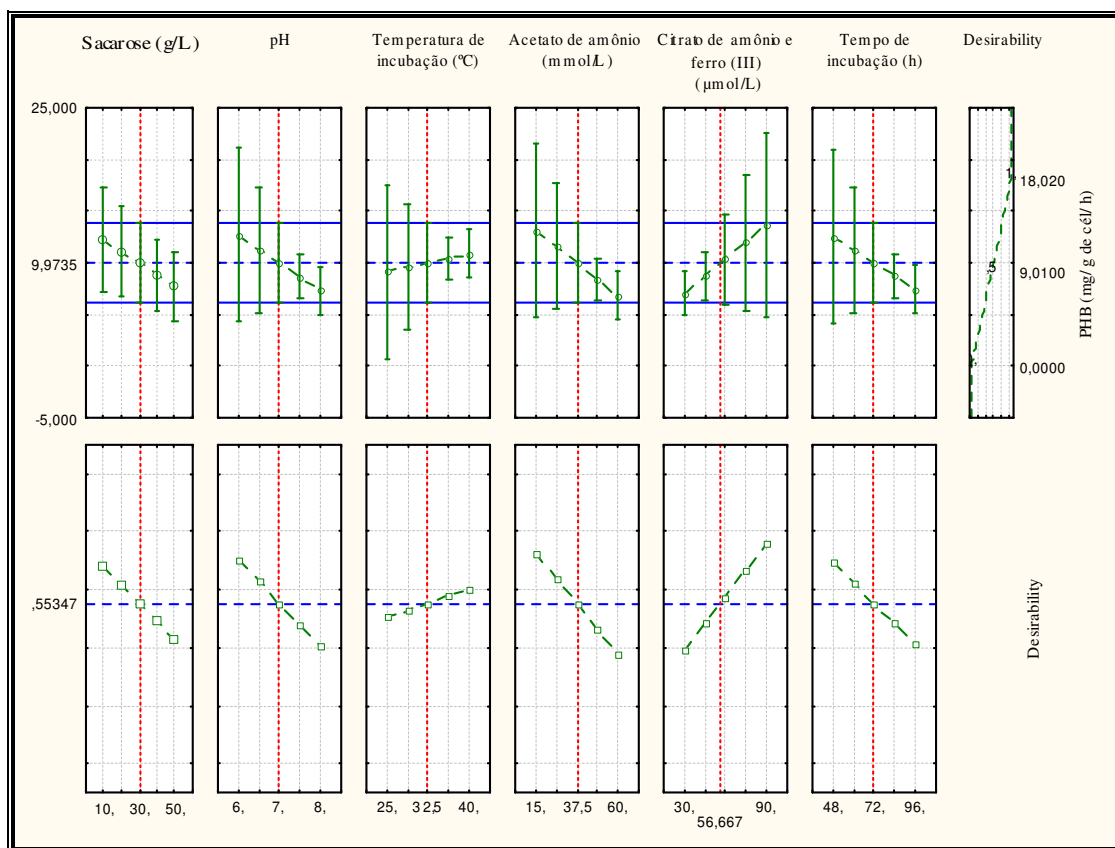


Figura 22. Perfil para predição de valores e desejabilidade (“Profiles for predicted values and desirability”) do primeiro planejamento experimental para sacarose.

Na Figura 22 pode-se notar que conforme diminui a concentração de sacarose, o pH, a concentração de acetato de amônio e o tempo de incubação aumenta-se a produção de PHB; já aumentando a temperatura de incubação e a concentração de citrato de amônio e ferro (III) também aumenta a produção de PHB. Dessa forma, utilizou-se estes resultados e os valores de significância ($p < 0,05$) para configurar o segundo planejamento experimental (item 4.4., Tabela 2).

O planejamento experimental fatorial completo 3^{3-0} para a sacarose, utilizado no estudo da biomassa, PHB e alginato com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ($p < 0,05$) encontra-se no Apêndice, Tabela 20.

No segundo planejamento experimental (3^{3-0}) utilizando como variáveis independentes a fonte de carbono, a temperatura e o tempo de incubação foi possível comprovar como no primeiro planejamento experimental que a biomassa foi maior entre 38 – 40°C, caracterizando como a faixa de temperatura ótima para seu crescimento em sacarose (Figura 23). Observou-se também que houve o favorecimento do crescimento celular com o aumento da

concentração de sacarose, este fato também foi observado no primeiro planejamento experimental.

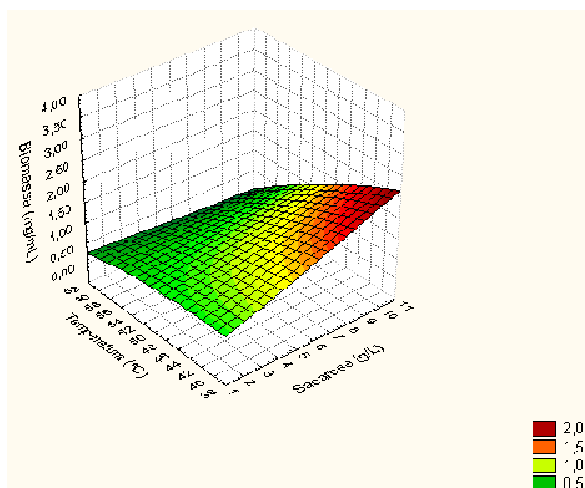


Figura 23. Superfícies de resposta para a biomassa (mg/mL) ao redor dos valores ótimos da concentração de sacarose (g L^{-1}) e temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) (equação: $-1,25+0,42*x+0,08*y+0,0011*x^2-0,0074*x*y-0,0009*y^2$).

Verificou-se também um aumento na produtividade do PHB de 12 para 45 mg/g de célula/h e do alginato de 100 para 1600 mg/g de célula/h. A produtividade máxima do PHB foi em menor tempo de incubação (18 h) devido à presença da *Azotobacter vinelandii* em alta temperatura (62°C), ocasionando uma rápida síntese do polímero nesta condição de estresse celular (Figura 24). O efeito positivo na produtividade do PHB em temperaturas elevadas também foi observado no primeiro planejamento experimental, assim como o fato da concentração ideal de sacarose ser aproximadamente de 10 g L^{-1} .

Para a produtividade do alginato notou-se, como no primeiro planejamento experimental, que essa foi elevada (1200 - 1600 mg/g de célula/h) quando utilizou-se maiores concentrações de sacarose, fato que contribui para entender que a produtividade de alginato é maior com o aumento da biomassa. Como no caso do PHB, a produtividade do alginato foi maior em tempo de incubação menor, pois como a temperatura apresentava-se alta (nas melhores condições de produção) houve a necessidade de uma maior produção de exopolissacarídeo pela bactéria como camada externa de defesa contra este ambiente hostil. Logo, a produtividade de ambos os compostos foi máxima na temperatura de incubação de 62°C , no menor tempo de incubação (18h) e sacarose na concentração de 11 g L^{-1} (Figura 24).

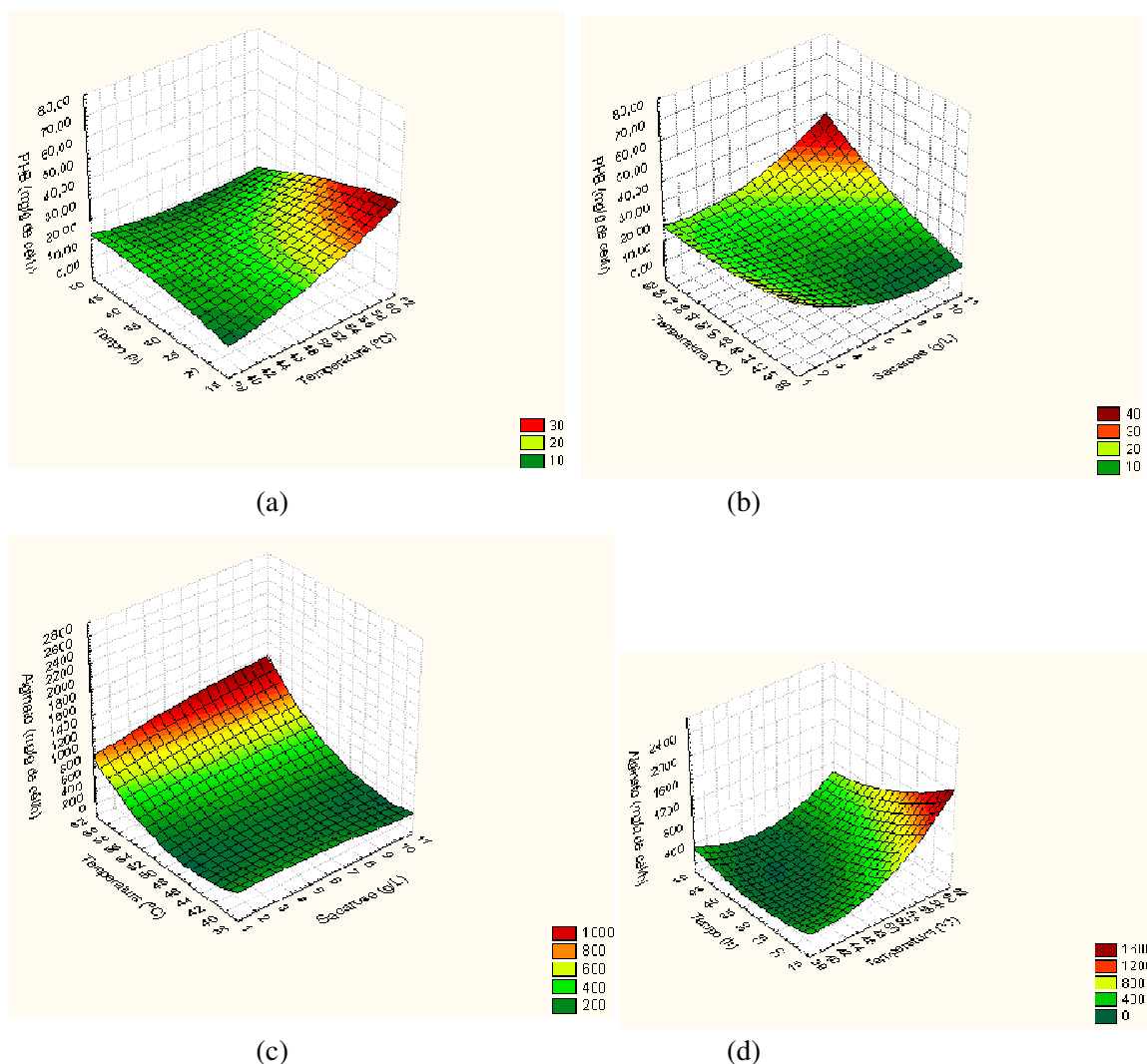


Figura 24. Superfícies de resposta para: (a) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e tempo de incubação (h) (equação: $-14,45-0,65*x+2,22*y+0,025*x^2-0,039*x*y-0,008*y^2$); (b) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de sacarose (g L^{-1}) e temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) (equação: $111,29-13,02*x-3,05*y+0,34*x^2+0,18*x*y+0,025*y^2$); (c) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de sacarose (g L^{-1}) e temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) (equação: $6083,66-72,24*x-260,50*y-2,27*x^2+2,26*x*y+2,80*y^2$); (d) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e tempo de incubação (h) (equação: $4424,19-203,39*x+8,96*y+2,80*x^2-1,32*x*y+0,66*y^2$).

O PHB extraído apresentou pureza entre 93,0 e 95,4% (Tabela 8).

Tabela 8. Valores de Pureza do PHB para o segundo experimento com a sacarose (3^{3-0})

Ensaio	Concentração teste de PHB ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância	Concentração determinada	% Pureza
		235 nm	($\mu\text{g/mL}$)	
1	5,00	0,7030	4,72	94,4
2	5,00	0,7055	4,73	94,7
3	5,00	0,7041	4,73	94,5
4	5,00	0,7052	4,73	94,6
5	5,00	0,7084	4,75	95,0
6	5,00	0,7099	4,76	95,1
7	5,00	0,6999	4,70	94,1
8	5,00	0,6987	4,70	93,9
9	5,00	0,6942	4,67	93,5
10	5,00	0,7125	4,77	95,4
11	5,00	0,7022	4,72	94,3
12	5,00	0,7011	4,71	94,2
13	5,00	0,7063	4,74	94,8
14	5,00	0,7086	4,75	95,0
15	5,00	0,7066	4,74	94,8
16	5,00	0,7011	4,71	94,2
17	5,00	0,7055	4,73	94,7
18	5,00	0,7036	4,72	94,5
19	5,00	0,7012	4,71	94,2
20	5,00	0,7033	4,72	94,4
21	5,00	0,6933	4,67	93,4
22	5,00	0,6900	4,65	93,0
23	5,00	0,6988	4,70	94,0
24	5,00	0,6952	4,68	93,6
25	5,00	0,6932	4,67	93,4
26	5,00	0,6900	4,65	93,0
27	5,00	0,6941	4,67	93,5
28	5,00	0,7082	4,75	95,0
29	5,00	0,6955	4,68	93,6
30	5,00	0,7014	4,71	94,2
31	5,00	0,6933	4,67	93,4
32	5,00	0,6941	4,67	93,5
33	5,00	0,6988	4,70	94,0
34	5,00	0,6955	4,68	93,6
35	5,00	0,6933	4,67	93,4
36	5,00	0,6947	4,68	93,5
37	5,00	0,7058	4,73	94,7
38	5,00	0,7021	4,72	94,3
39	5,00	0,7036	4,72	94,5
40	5,00	0,7100	4,76	95,1
41	5,00	0,7099	4,76	95,1
42	5,00	0,7065	4,74	94,8
43	5,00	0,7025	4,72	94,3

Continuação

Ensaio	Concentração teste de PHB ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância 235 nm	Concentração determinada ($\mu\text{g/mL}$)	% Pureza
44	5,00	0,7036	4,72	94,5
45	5,00	0,7100	4,76	95,1
46	5,00	0,7014	4,71	94,2
47	5,00	0,7036	4,72	94,5
48	5,00	0,7025	4,72	94,3
49	5,00	0,7068	4,74	94,8
50	5,00	0,7065	4,74	94,8
51	5,00	0,7100	4,76	95,1
52	5,00	0,7056	4,73	94,7
53	5,00	0,7088	4,75	95,0
54	5,00	0,7096	4,75	95,1
55	5,00	0,6958	4,68	93,6
56	5,00	0,6955	4,68	93,6
57	5,00	0,6933	4,67	93,4
58	5,00	0,6984	4,70	93,9
59	5,00	0,6947	4,68	93,5
60	5,00	0,6987	4,70	93,9
61	5,00	0,7012	4,71	94,2
62	5,00	0,7059	4,74	94,7
63	5,00	0,7060	4,74	94,7
64	5,00	0,7023	4,72	94,3
65	5,00	0,7054	4,73	94,7
66	5,00	0,7023	4,72	94,3
67	5,00	0,7099	4,76	95,1
68	5,00	0,6988	4,70	94,0
69	5,00	0,6987	4,70	93,9
70	5,00	0,7012	4,71	94,2
71	5,00	0,6987	4,70	93,9
72	5,00	0,7012	4,71	94,2
73	5,00	0,6933	4,67	93,4
74	5,00	0,7012	4,71	94,2
75	5,00	0,7033	4,72	94,4
76	5,00	0,7056	4,73	94,7
77	5,00	0,6987	4,70	93,9
78	5,00	0,6931	4,67	93,4
79	5,00	0,6945	4,68	93,5
80	5,00	0,6987	4,70	93,9
81	5,00	0,7100	4,76	95,1

5.3. GLICOSE

5.3.1. Primeiro Planejamento Experimental

No primeiro planejamento experimental para a glicose pode-se observar na análise de variância (ANOVA) realizada, com o auxílio do software Statistica 6.0, que nenhuma das variáveis independentes estudadas apresentou significância estatística ($\rho < 0,05$) no crescimento bacteriano (Tabela 9). Entretanto, a metodologia de superfície de resposta mostrou que a biomassa (valor máximo = 2,54 mg mL⁻¹) foi favorecida pela menor concentração de glicose (5 – 10 g L⁻¹); menor temperatura de incubação (24 – 27°C) e o maior tempo de incubação (90 – 100 h) favoreceu o crescimento celular, comportamento oposto ao experimento realizado com sacarose (Figura 25).

Tabela 9. Planejamento experimental fatorial fracionado 2⁶⁻² (com duas repetições no ponto central) para a glicose, utilizado no estudo da biomassa, PHB e alginato com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ($\rho < 0,05$)

Ensaio	X1 Concentração de glicose (g/L)	X2 pH	X3 Temperatura de incubação (°C)	X4 Acetato de amônio (mmol/L)	X5 Citrato de amônio e ferro (III) (µmol/L)	X6 Tempo de incubação (h)	Biomassa (mg/mL) • $\rho =$ nenhum	PHB (mg/g de cel/h)	Alginato (mg/g de cel/h)
								• $\rho =$ X1; X3; X6; X1*X3, X2*X4; X1*X2*X4	• $\rho =$ X2; X6; X1*X2
1	10,0	6	25	15	30	48	1,14	28,66	158,39
2	50,0	6	25	15	90	48	0,12	187,47	3364,51
3	10,0	8	25	15	90	96	3,22	12,32	5,53
4	50,0	8	25	15	30	96	3,48	13,05	0,00
5	10,0	6	40	15	90	96	2,50	9,01	22,94
6	50,0	6	40	15	30	96	1,99	26,70	211,48
7	10,0	8	40	15	30	48	2,30	13,04	53,23
8	50,0	8	40	15	90	48	2,37	17,55	0,00
9	10,0	6	25	60	30	96	5,31	8,38	0,00
10	50,0	6	25	60	90	96	2,70	19,28	0,00
11	10,0	8	25	60	90	48	0,93	65,47	205,28
12	50,0	8	25	60	30	48	0,17	495,69	0,00
13	10,0	6	40	60	90	48	1,33	43,28	77,14
14	50,0	6	40	60	30	48	1,82	18,55	434,52
15	10,0	8	40	60	30	96	1,34	19,10	0,00
16	50,0	8	40	60	90	96	2,24	14,71	0,00
17*	30,0	7	32,5	37,5	60	72	2,65	26,14	119,02
18*	30,0	7	32,5	37,5	60	72	4,26	25,68	0,00

* Pontos centrais.

• $\rho =$ variável independente significativa estatisticamente ($\rho < 0,05$).

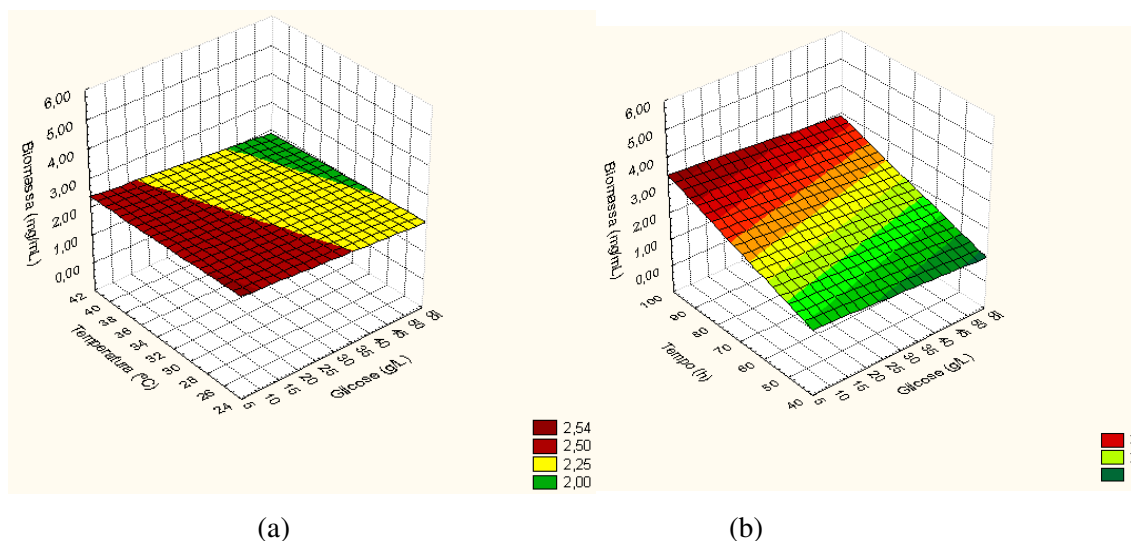


Figura 25. (a) Superfícies de resposta para a biomassa (mg/mL) ao redor dos valores ótimos da concentração de glicose (g L^{-1}) e temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) (equação: $2,83-0,0099*x-0,0097*y$); (b) Superfícies de resposta para a biomassa (mg/mL) ao redor dos valores ótimos da concentração de glicose (g L^{-1}) e tempo de incubação (h) (equação: $0,1542-0,0099*x+0,0328*y$).

Os resultados da análise da produção de alginato por meio da análise de variância (ANOVA) mostraram que o pH (X2), o tempo (X6), e a interação entre a fonte de carbono (glicose) e o pH (X1*X2) foram significativos estatisticamente ($p < 0,05$) para a produção deste exopolissacarídeo (Tabela 9). Com o auxílio da metodologia de superfície de resposta pode-se observar que a máxima produção de alginato (1000 mg/g de célula/h) ocorreu nas maiores concentrações de glicose ($45\text{-}55 \text{ g L}^{-1}$) e no menor tempo de incubação (40-50 h), como no experimento para sacarose. Supõe-se que este comportamento deve-se à necessidade de adaptação ao novo meio de fermentação e às diferentes condições de cultivo, fazendo com que a célula bacteriana produza mais alginato nas primeiras horas. Já a temperatura de produção máxima do alginato encontra-se entre as temperaturas mais baixas, $24\text{-}29^{\circ}\text{C}$, e os melhores valores de pH em torno de $5,8 - 6,2$ (Figura 26).

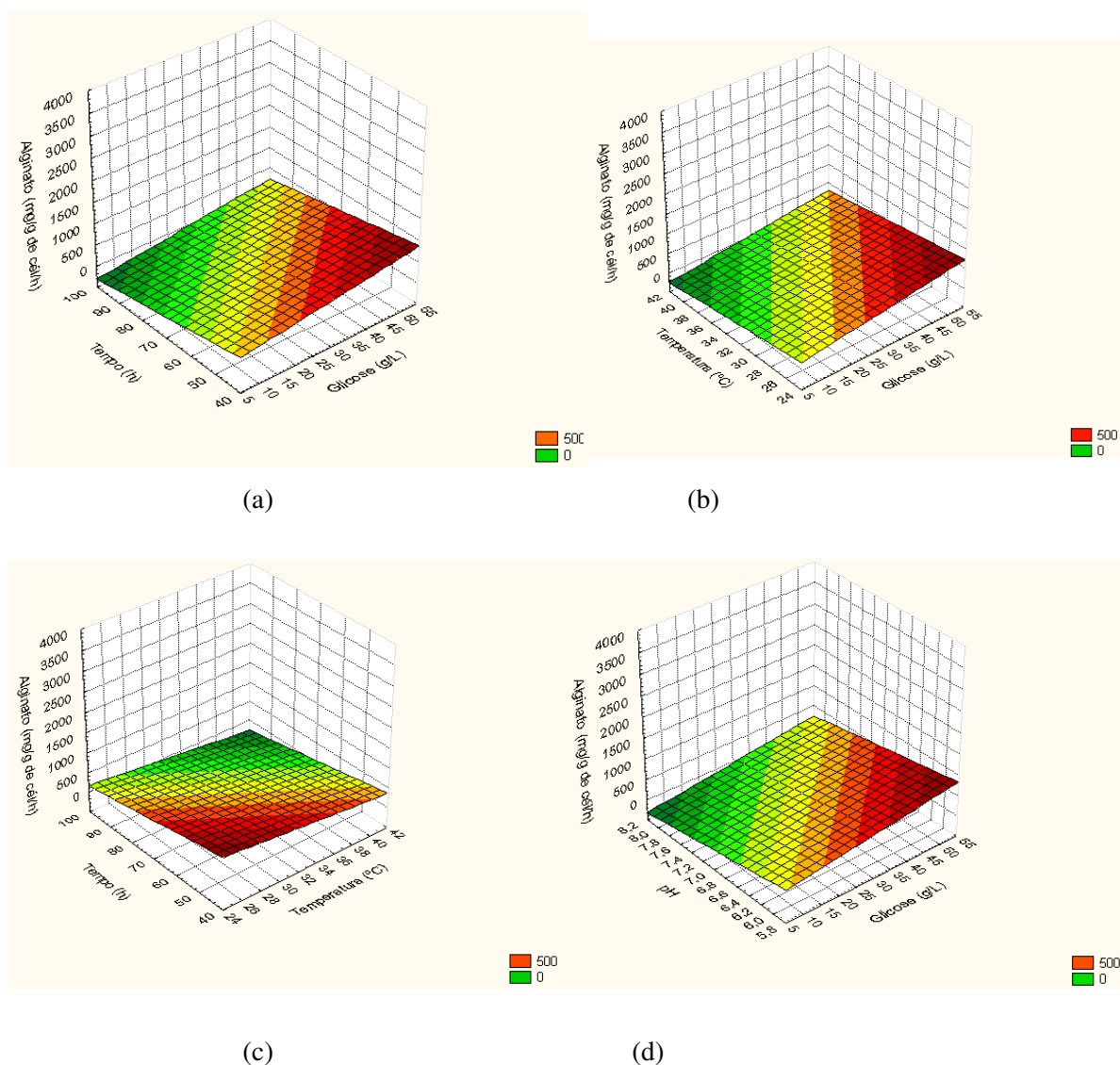


Figura 26. Superfícies de resposta para: (a) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de glicose (g L^{-1}) e tempo de incubação (h) (equação: $691,41+10,9*x-10,55*y$); (b) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de glicose (g L^{-1}) e temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) (equação: $726,18+10,9*x-24,45*y$); (c) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) e tempo de incubação ($^{\circ}\text{C}$) (equação: $1813,14-24,45*x-10,55*y$); (d) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de glicose (g L^{-1}) e pH (equação: $1683,61+10,9*x-250,31*y$).

A produção de PHB apresentou três variáveis independentes significativas: a concentração de glicose (X1); a temperatura (X3) e o tempo de incubação (X6), além das interações das variáveis: concentração de glicose com a temperatura (X1*X3), pH com

acetato de amônio (X2*X4) e a interação entre concentração de glicose, pH e acetato de amônio (X1*X2*X4) (Tabela 9). Para a variável X1 pode-se observar um efeito positivo, pois quanto maior a concentração de glicose utilizada, maior a produção de PHB; já as variáveis X3 e X6 apresentaram um efeito negativo, ou seja, quanto menor os seus valores maior a produção. Com o estudo da metodologia de superfície de resposta, pode-se notar que a produtividade de PHB foi máxima (150 mg/g de células/h) na menor temperatura de incubação (24-26°C), no menor tempo de incubação (40-50 h) e na maior concentração de glicose utilizada (45-55 g L⁻¹) como mostra a Figura 27.

Quillaguamán e colaboradores (2008) utilizaram o microrganismo *Halomonas boliviensis* num meio contendo glicose 20 g L⁻¹ como fonte de carbono, além de 0,1% de aminoácido (ácido aspártico, glutamina, alanina, arginina, cisteína, triptofano ou glicina), pH 7,5 e cultura em *fed-batch* por 30h e obtiveram uma produtividade de PHB igual a 26,8 mg/g de cel/h. Neste mesmo ano, Van-Thuoc e colaboradores (2008) utilizaram o *Halomonas boliviensis* LC1 em um meio contendo 10 g L⁻¹ de glicose, 0,2 g L⁻¹ de extrato de levedura e sais minerais. A fermentação foi realizada em um fermentador de 2 L e a produtividade do PHB foi de 13,1 mg/g de cél/h.

Outro microrganismo empregado foi o *Bacillus cereus* CFR06 no trabalho de Halami (2008), sendo o meio de fermentação composto por 20 g L⁻¹ de glicose e sais minerais, a produtividade de PHB foi de 6,9 mg/g de cél/h. Os pesquisadores Ghatnekar, Pai e Ganesh (2002) utilizaram o *Methylobacterium* sp V 49 na produção do PHB com um meio de fermentação contendo 15 g L⁻¹ de glicose e sais minerais e, a produtividade foi de 24 mg/g de cel/h. Esses autores, embora muitas vezes utilizassem além de glicose outras fontes de carbono como aminoácidos, numa tentativa de aumentar a produção de PHB, os valores de produtividade ficaram muito abaixo do valor encontrado neste trabalho utilizando *A. vinelandii* e somente glicose como fonte de carbono. Já Cho e colaboradores (2001) também utilizaram o *A. vinelandii* e 50 g L⁻¹ de glicose, além de resíduos da suinocultura e obtiveram somente 15 mg/g de cél/h de produtividade de PHB quando comparado com este trabalho que mostrou uma produtividade de 150 mg/g de cél/h.

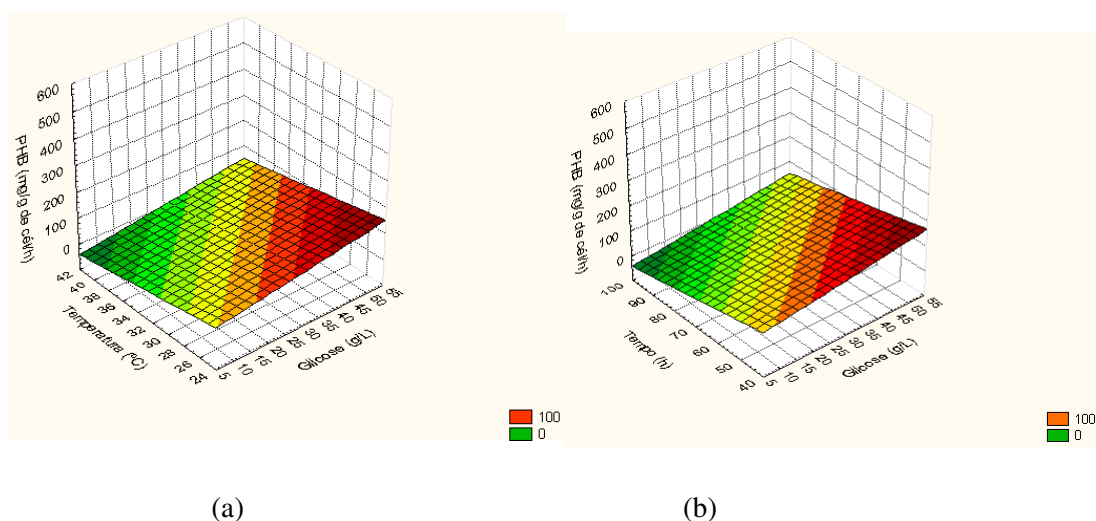


Figura 27. Superfícies de resposta para: (a) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de glicose (g L^{-1}) e temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) (equação: $183,36+1,85*x-5,57*y$); (b) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de glicose (g L^{-1}) e tempo de incubação (h) (equação: $142,43+1,85*x-1,94*y$).

O PHB extraído apresentou pureza entre 93,0 e 95,0% (Tabela 10).

Tabela 10. Valores de Pureza do PHB para o primeiro experimento com a glicose (2^{6-2})

Ensaio	Concentração teste de PHB ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância 235 nm	Concentração determinada ($\mu\text{g/mL}$)	% Pureza
1	5,00	0,7056	4,73	94,7
2	5,00	0,7054	4,73	94,7
3	5,00	0,7023	4,72	94,3
4	5,00	0,7063	4,74	94,8
5	5,00	0,6900	4,65	93,0
6	5,00	0,6987	4,70	93,9
7	5,00	0,6999	4,70	94,1
8	5,00	0,7021	4,72	94,3
9	5,00	0,7045	4,73	94,6
10	5,00	0,7026	4,72	94,4
11	5,00	0,7089	4,75	95,0
12	5,00	0,7056	4,73	94,7
13	5,00	0,7023	4,72	94,3
14	5,00	0,7024	4,72	94,3
15	5,00	0,7023	4,72	94,3
16	5,00	0,7024	4,72	94,3
17	5,00	0,7026	4,72	94,4
18	5,00	0,7021	4,72	94,3

5.3.2. Segundo Planejamento Experimental

O segundo planejamento experimental para glicose foi realizado com base nos gráficos de perfil para predição de valores e desejabilidade da produtividade do PHB (“Profiles for predicted values and desirability”) do primeiro planejamento experimental com o auxílio do software Statistica 6.0 (Figura 28).

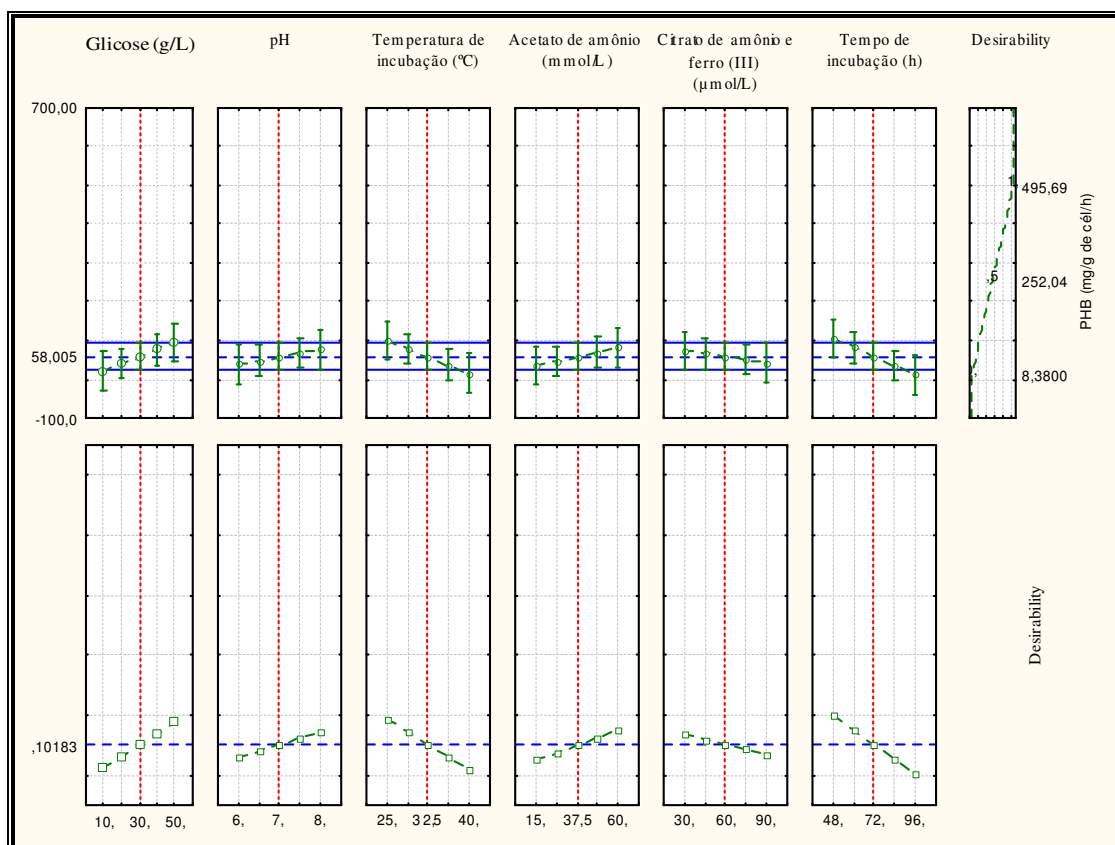


Figura 28. Perfil para predição de valores e desejabilidade (“Profiles for predicted values and desirability”) do primeiro planejamento experimental para glicose.

Na Figura 28 pode-se notar que conforme se aumenta a concentração de glicose, o pH e a concentração de acetato de amônio aumenta-se a produção de PHB; já diminuindo a temperatura, o tempo e a concentração de citrato de amônio e ferro (III) também aumenta-se a produção de PHB. Portanto, estes resultados e os valores de significância ($p < 0,05$) foram utilizados para configurar o segundo planejamento experimental (item 4.4., Tabela 4).

No segundo planejamento experimental para a glicose pode-se observar na análise de variância (ANOVA) realizada com o auxílio do software Statistica 6.0 que o tempo de incubação e a interação entre a temperatura e o tempo de incubação apresentaram significância estatística ($p < 0,05$) no crescimento bacteriano (Tabela 11).

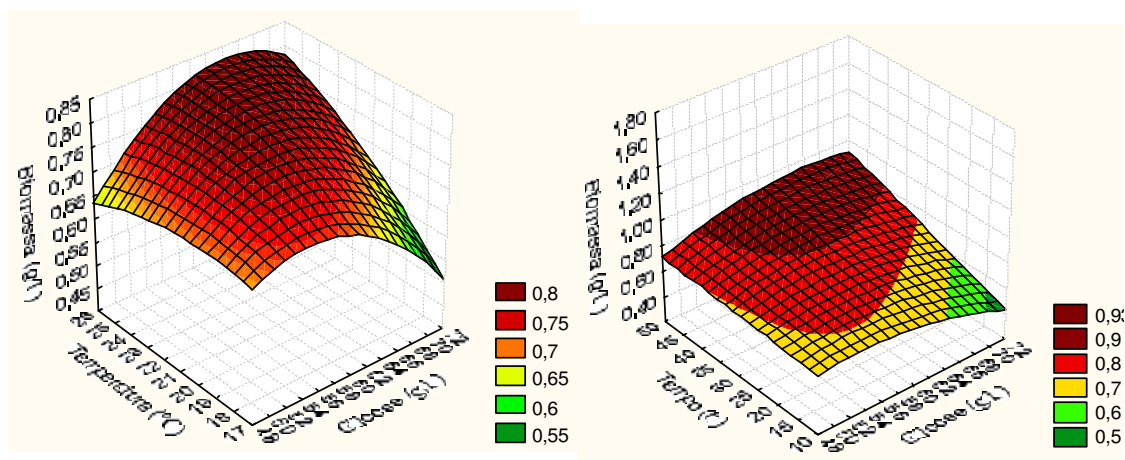
No segundo planejamento experimental (3^{3-0}) utilizando como variáveis independentes a fonte de carbono, a temperatura e o tempo de incubação foi possível comprovar que igualmente ao primeiro experimento utilizando glicose, o tempo de incubação no qual a biomassa foi máxima ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) apresentou-se em 48h e a melhor temperatura de incubação entre 20 – 28°C. Já a concentração de glicose apresentou-se como ótima para o crescimento celular no intervalo entre 54 – 72 g L^{-1} (Figura 29).

Tabela 11. Planejamento experimental fatorial completo 3^{3-0} com três repetições no ponto central para a glicose utilizado no estudo da biomassa, PHB e alginato com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ($p < 0,05$)

Ensaio	X1 Concentração de glicose (g/L)	X2 Temperatura de incubação (°C)	X3 Tempo de incubação (h)	Biomassa (mg/mL) * $p = X3; X2*X3$	PHB (mg/g de cél/h) * $p = X3$	Alginato (mg/g de cél/h) * $p = X1*X3$
1	50,0	18,0	12	0,64	34,54	178,51
2	50,0	18,0	30	0,63	19,54	53,71
3	50,0	18,0	48	0,63	12,40	55,36
4	50,0	21,5	12	0,89	93,24	140,85
5	50,0	21,5	30	0,82	8,56	80,69
6	50,0	21,5	48	0,76	13,20	81,19
7	50,0	25,0	12	0,55	24,99	113,67
8	50,0	25,0	30	0,74	59,93	98,83
9	50,0	25,0	48	0,68	36,44	61,61
10	60,0	18,0	12	0,61	14,30	70,24
11	60,0	18,0	30	1,07	3,49	80,36
12	60,0	18,0	48	0,55	12,84	51,63
13	60,0	21,5	12	0,68	102,68	166,64
14	60,0	21,5	30	0,69	33,32	92,79
15	60,0	21,5	48	1,17	1,55	26,36
16	60,0	25,0	12	0,33	59,63	781,71
17	60,0	25,0	30	0,79	58,88	335,80
18	60,0	25,0	48	1,12	3,27	29,09
19	70,0	18,0	12	0,85	11,87	5881,04
20	70,0	18,0	30	0,62	26,85	146,82
21	70,0	18,0	48	0,45	19,96	139,40
22	70,0	21,5	12	0,59	27,64	266,23
23	70,0	21,5	30	0,47	19,62	299,34
24	70,0	21,5	48	0,62	9,06	186,95
25	70,0	25,0	12	0,28	75,72	19517,95
26	70,0	25,0	30	0,77	43,12	128,95
27	70,0	25,0	48	1,58	15,61	24,51
28*	60,0	21,5	30	0,70	31,87	84,29
29*	60,0	21,5	30	0,41	140,92	114,69
30*	60,0	21,5	30	1,17	7,46	143,39

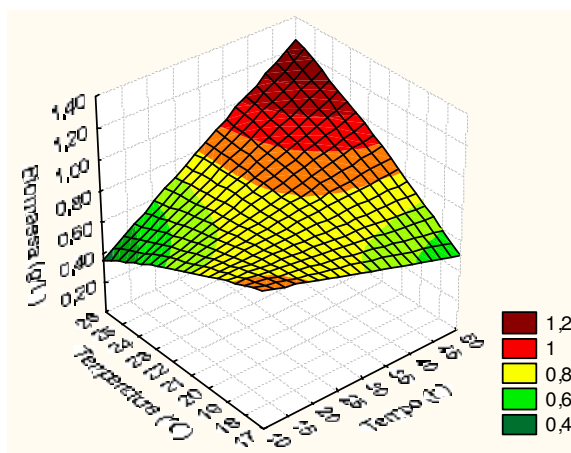
* Pontos centrais.

* $p =$ variável independente significativa estatisticamente ($p < 0,05$).



(a)

(b)

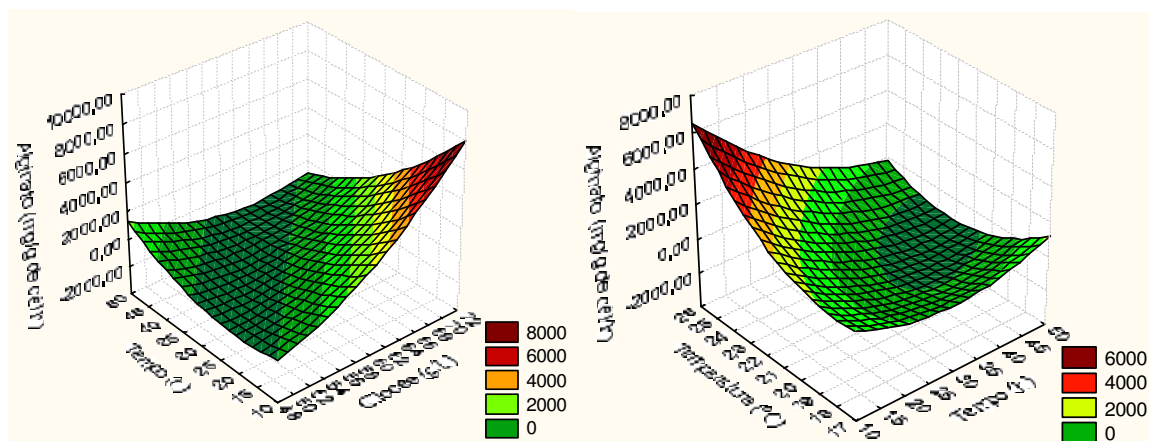


(c)

Figura 29. (a) Superfícies de resposta para a biomassa (mg/mL) ao redor dos valores ótimos da concentração de glicose (g L^{-1}) e temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) (equação: $2,12+0,039*x-0,00070*x^2-0,12*y-0,0015*y^2+0,0015*x*y$); (b) Superfícies de resposta para a biomassa (mg/mL) ao redor dos valores ótimos da concentração de glicose (g L^{-1}) e tempo de incubação (h) (equação: $2,12+0,039*x-0,00070*x^2-0,096*y-0,0000094*y^2+0,00044*x*y$); (c) Superfícies de resposta para a biomassa (mg/mL) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) (equação: $2,12-0,12*y-0,0015*y^2-0,096*x-0,0000094*x^2+0,00036*y*x$).

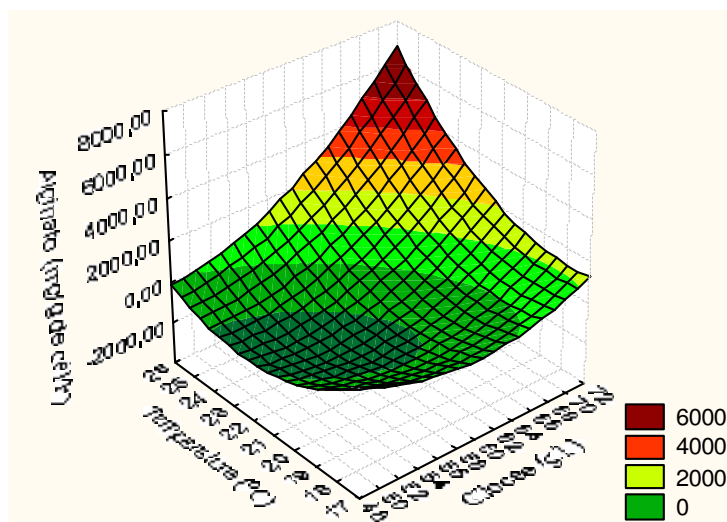
Com o segundo planejamento experimental pode-se notar um aumento na produtividade do alginato de 1000 para 6000 mg/g de célula/h. Como observado no primeiro planejamento a concentração ideal de glicose foi a maior testada ($68 - 72 \text{ g L}^{-1}$) na

temperatura de incubação entre 24 – 26°C e no menor tempo de incubação, aproximadamente 12 h (Figura 30).



(a)

(b)

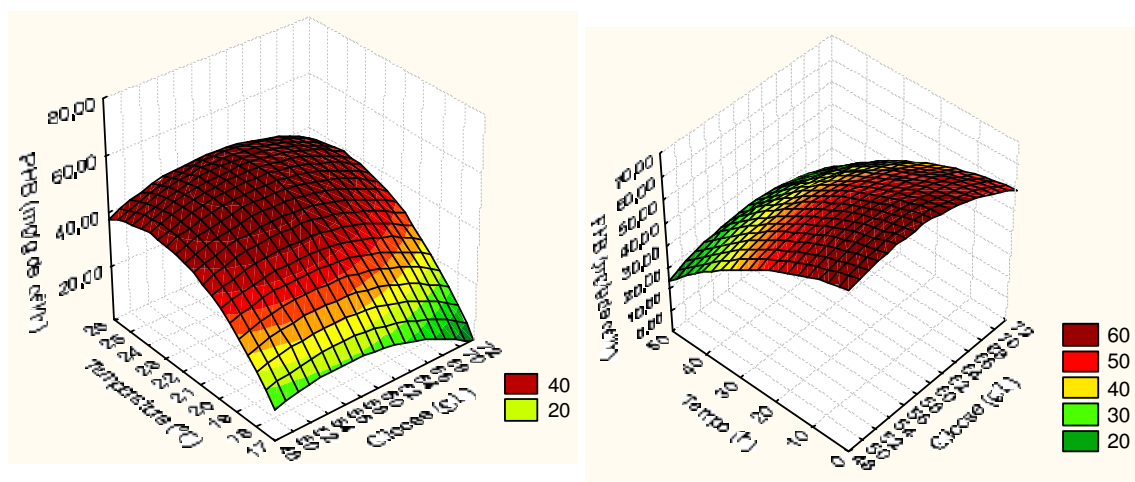


(c)

Figura 30. Superfícies de resposta para: (a) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de glicose ($g L^{-1}$) e tempo de incubação (h) (equação: $75469,44-1409,96*x+10,08*x^2+828,52*y+3,27*y^2-11,61*x*y-64165,28$); (b) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e temperatura de incubação ($^{\circ}C$) (equação: $75469,44-4838,92*y+86,25*y^2+828,52*x+3,27*x^2-19,07*y*x-48320,26$); (c) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de glicose ($g L^{-1}$) e temperatura de incubação ($^{\circ}C$) (equação:

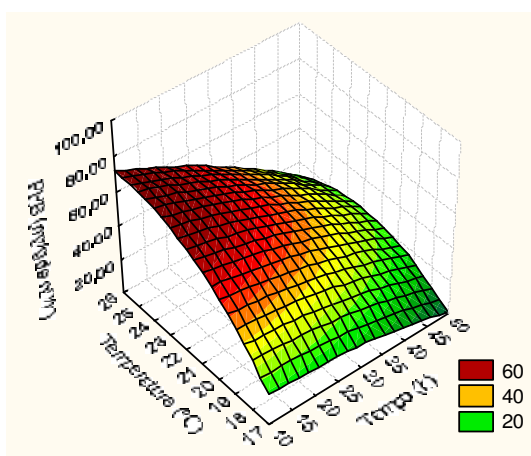
$$75469,44 - 1409,954 * x + 10,08 * x^2 - 4838,92 * y + 86,25 * y^2 + 32,18 * x * y).$$

Na Figura 31 observa-se uma diminuição na produtividade do PHB de 150 para 60 mg/g de célula/h, embora a produtividade tenha diminuído no segundo planejamento experimental para a glicose as condições ótimas de produtividade continuaram semelhantes, ou seja, no menor tempo de incubação (10 – 20 h), na temperatura entre 21 – 26°C e na concentração de glicose entre 48 – 68 g L⁻¹.



(a)

(b)



(c)

Figura 31. Superfícies de resposta para: (a) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de glicose (g L⁻¹) e temperatura de incubação (°C) (equação: $-573,46 + 5,95 * x - 0,063 * x^2 + 37,37 * y - 0,77 * y^2 + 0,049 * x * y$); (b) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos

valores ótimos de concentração de glicose ($g L^{-1}$) e tempo de incubação (h) (equação: $-573,46+5,95*x-0,063*x^2+1,66*y-0,011*y^2+0,0093*x*y$); (c) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e temperatura de incubação ($^{\circ}C$) (equação: $-573,46+37,37*y-0,77*y^2+1,66*x-0,011*x^2-0,12*y*x$).

A pureza do PHB foi determinada segundo a metodologia de Law e Slepecky (1961) utilizando uma curva de calibração do PHB (Apêndice, Figura 40) e o PHB extraído apresentou pureza entre 93,4 e 95,1% (Tabela 12).

Tabela 12. Valores de Pureza do PHB para o segundo experimento com a glicose (3^{3-0})

Ensaio	Concentração teste de PHB ($\mu g/mL$)	Absorbância	Concentração determinada	
		235 nm	($\mu g/mL$)	% Pureza
1	5,00	0,6988	4,70	94,0
2	5,00	0,6955	4,68	93,6
3	5,00	0,6933	4,67	93,4
4	5,00	0,6947	4,68	93,5
5	5,00	0,7058	4,73	94,7
6	5,00	0,7021	4,72	94,3
7	5,00	0,7036	4,72	94,5
8	5,00	0,7100	4,76	95,1
9	5,00	0,7099	4,76	95,1
10	5,00	0,7065	4,74	94,8
11	5,00	0,7025	4,72	94,3
12	5,00	0,6988	4,70	94,0
13	5,00	0,6955	4,68	93,6
14	5,00	0,6933	4,67	93,4
15	5,00	0,6947	4,68	93,5
16	5,00	0,7058	4,73	94,7
17	5,00	0,7021	4,72	94,3
18	5,00	0,7036	4,72	94,5
19	5,00	0,7100	4,76	95,1
20	5,00	0,7099	4,76	95,1
21	5,00	0,7065	4,74	94,8
22	5,00	0,7025	4,72	94,3
23	5,00	0,6988	4,70	94,0
24	5,00	0,6955	4,68	93,6
25	5,00	0,6933	4,67	93,4
26	5,00	0,6947	4,68	93,5
27	5,00	0,7058	4,73	94,7
28	5,00	0,7021	4,72	94,3
29	5,00	0,7036	4,72	94,5
30	5,00	0,7100	4,76	95,1

5.4. MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

5.4.1. Primeiro Planejamento Experimental

Os resultados obtidos nos experimentos realizados com melaço de cana-de-açúcar mostraram que apenas a variável independente temperatura de incubação foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para o crescimento celular da *A. vinelandii* (Tabela 13). Entretanto, com a metodologia de superfície de resposta pode-se observar que a biomassa (5 mg mL^{-1}) foi favorecida pelas maiores concentrações de sólidos solúveis, comportamento semelhante ao obtido com a utilização de sacarose como substrato. A menor temperatura de incubação (24°C) e o maior tempo de incubação favoreceram o crescimento celular, comportamentos opostos ao experimento com sacarose. Isto, se deve à necessidade de um maior tempo de adaptação à este meio de fermentação, uma vez que, o melaço é nutricionalmente um meio mais complexo (Figura 32).

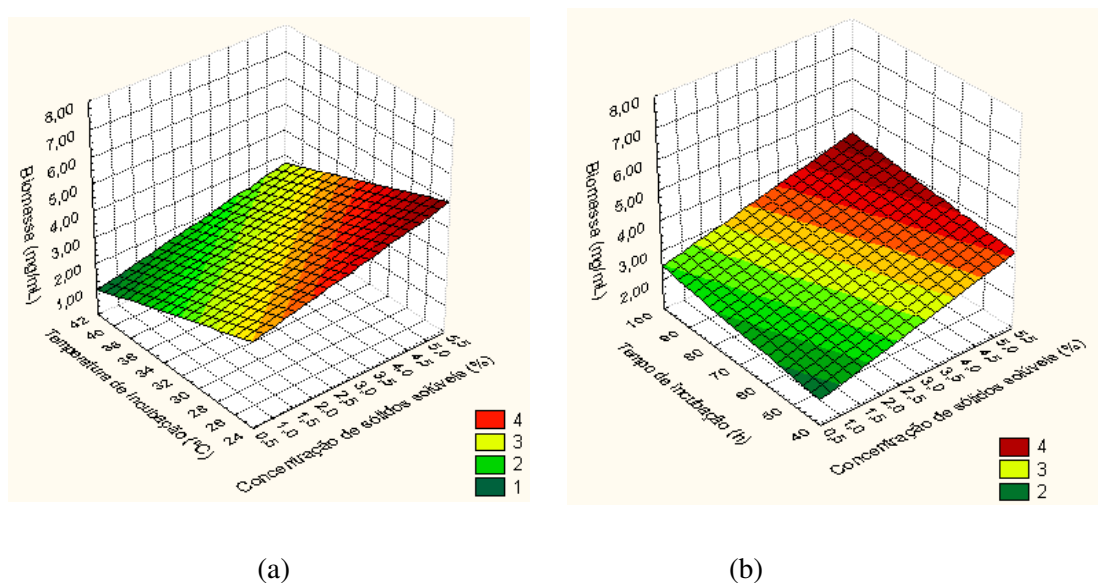


Figura 32. (a) Superfícies de resposta para a biomassa (mg/mL) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e temperatura de incubação ($^\circ\text{C}$) (equação: $6,17+0,34*x-0,13*y$); (b) Superfícies de resposta para a biomassa (mg/mL) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e tempo de incubação (h) (equação: $1,23+0,34*x+0,011*y$).

Tabela 13. Planejamento experimental fatorial fracionado 2^{6-2} (com duas repetições no ponto central) para o melaço de cana-de-açúcar, utilizado no estudo da biomassa, PHB e alginato com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ($\rho < 0,05$)

Ensaio	X1 Concentração de sólidos solúveis (%)	X2 pH	X3 Temperatura de incubação (°C)	X4 Acetato de amônio (mmol/L)	X5 Citrato de amônio e ferro (III) ($\mu\text{mol/L}$)	X6 Tempo de incubação (h)	Biomassa (mg/mL) * $\rho = X3$	PHB (mg/g de cel/h) * $\rho = X6$	Alginato (mg/g de cel/h) * $\rho = X1; X2;$ * $\rho = X6; X1*X3$
1	1	6	25	15	30	48	2,92	9,75	36,35
2	5	6	25	15	90	48	3,79	8,07	80,07
3	1	8	25	15	90	96	2,77	2,99	0,00
4	5	8	25	15	30	96	6,68	3,42	30,08
5	1	6	40	15	90	96	1,93	8,17	9,16
6	5	6	40	15	30	96	1,75	17,80	254,90
7	1	8	40	15	30	48	2,53	9,84	51,93
8	5	8	40	15	90	48	1,71	16,33	218,37
9	1	6	25	60	30	96	2,24	3,20	0,00
10	5	6	25	60	90	96	6,88	5,91	23,60
11	1	8	25	60	90	48	2,04	47,73	32,79
12	5	8	25	60	30	48	4,65	13,12	122,51
13	1	6	40	60	90	48	2,36	25,84	44,18
14	5	6	40	60	30	48	2,19	42,38	467,88
15	1	8	40	60	30	96	2,00	6,50	24,69
16	5	8	40	60	90	96	2,11	6,82	175,53
17*	3	7	32,5	37,5	60	72	2,00	3,42	100,25
18*	3	7	32,5	37,5	60	72	1,99	8,76	103,25

* Pontos centrais.

* ρ = variável independente significativa estatisticamente ($\rho < 0,05$).

A metodologia da análise de variância (ANOVA) no estudo da produção de alginato revelou que três variáveis independentes foram significativas ($\rho < 0,05$) na produção deste exopolissacarídeo sendo: a concentração de sólidos solúveis (X1), o pH (X2) e o tempo de incubação (X6), além da interação entre a concentração de sólidos solúveis e a temperatura de incubação (X1*X3) (Tabela 13). Pode-se notar nos gráficos da metodologia de superfície de resposta que a temperatura teve um efeito positivo na produção de alginato, sendo maior a síntese deste exopolissacarídeo pela bactéria como resposta a temperatura elevada (40-42°C), funcionando como mecanismo de defesa ao ambiente com temperatura elevada. A produtividade também foi maior com o aumento da concentração de sólidos solúveis, provando que esta é maior com o aumento de biomassa, comportamento semelhante aos experimentos com sacarose. Já o tempo de incubação e o pH apresentaram um efeito negativo, pois quanto menor o tempo de incubação (40-50 h) e o pH (5,8-7,4) maior a produção de alginato (Figura 33).

A produtividade máxima obtida para o alginato utilizando melação de cana-de-açúcar como fonte de carbono foi entre 200-280 mg/g de cél/h. Entre os trabalhos pesquisados na literatura não foi encontrado nenhum que estudasse a produção de alginato utilizando substratos alternativos como o melação, mas somente açúcares refinados como a glicose e sacarose.

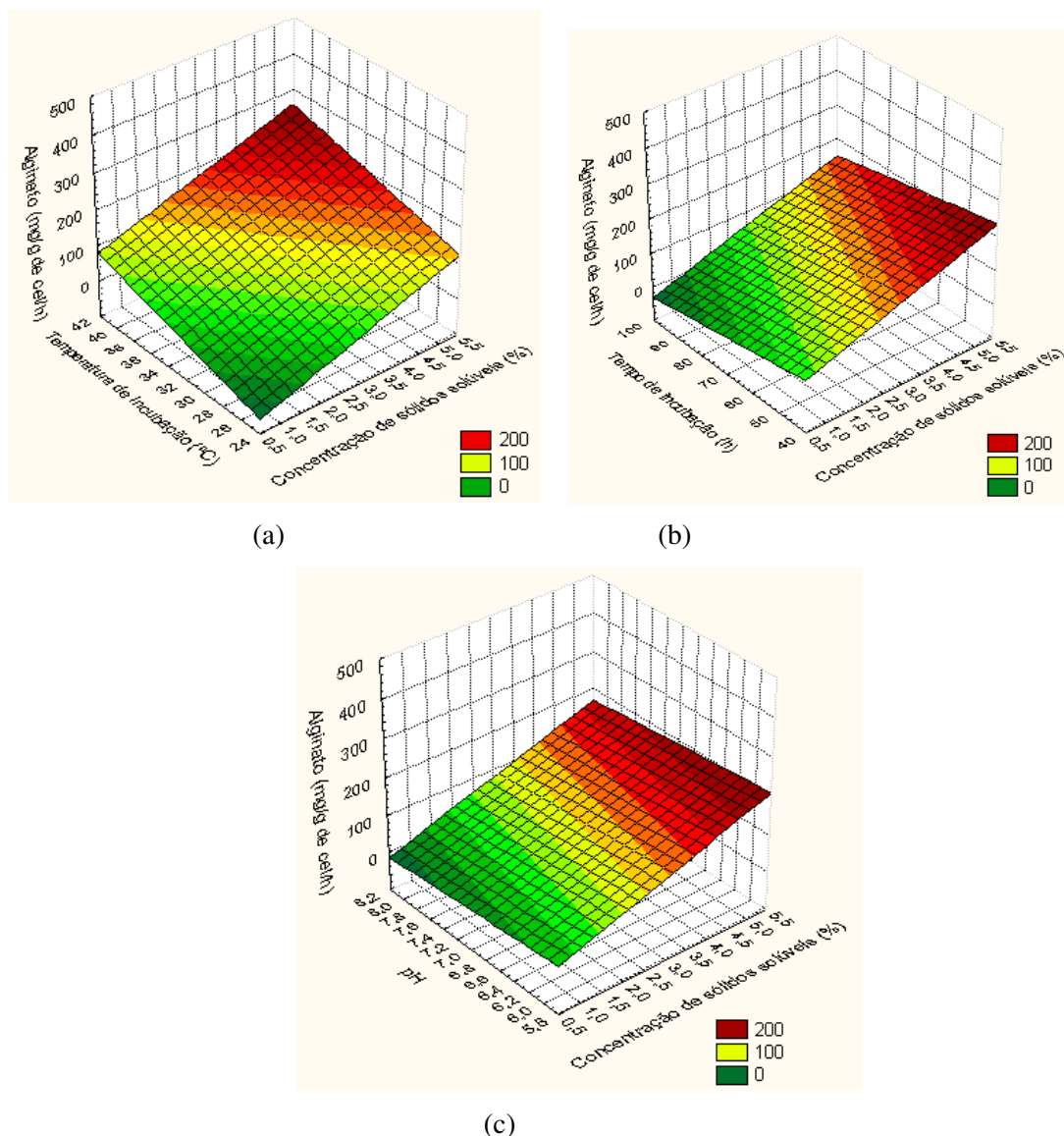


Figura 33. Superfícies de resposta para: (a) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e temperatura de incubação (°C) (equação: $-261,29+36,68*x+7,68*y$); (b) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e tempo de incubação (h) (equação: $88,73+36,68*x-1,39*y$); (c) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e pH (equação: $102,06+36,68*x-16,26*y$).

O estudo da produção de PHB pela análise de variância (ANOVA) mostrou que apenas o tempo de incubação foi significativo estatisticamente, apresentando um efeito negativo, ou seja, a produção deste polímero foi maior em menores temperaturas de incubação (Tabela 13). Com a metodologia de superfície de resposta foi possível observar que a produção de PHB foi máxima (PHB = 27 mg/g de células/h) no menor tempo de incubação (40 h) e na maior temperatura de incubação (42°C), como nos experimentos realizados com sacarose. Já as concentrações de melação de cana-de-açúcar testadas não foram significativas para a produção de PHB como mostra a Figura 34.

Quagliano e colaboradores (2001) utilizaram a bactéria *Azotobacter chroococcum* 6B em um meio contendo 5% de melação de cana-de-açúcar e sais minerais e, obtiveram como produtividade o valor de 16 mg/g de cél/h, sendo este resultado inferior ao obtido neste trabalho. Já os pesquisadores Kim e Chang (1998) também utilizaram a *A. chroococcum* e a produtividade foi de apenas 6,43 mg/g de cél/h, usando o amido solúvel (20-30 g L⁻¹) como substrato alternativo acrescido de sais minerais.

Outro exemplo da utilização de substratos alternativos encontra-se no trabalho de Haba e colaboradores (2007), no qual foi utilizada a *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 em um meio contendo 4% de resíduo de óleo de cozinha, 2% de ácido oléico de grau analítico, 2% de resíduos de ácidos graxos livres, além de 40 g L⁻¹ de glicose. A produtividade do PHB foi de 7,55 mg/g de cél/h, sendo este valor abaixo do obtido neste trabalho utilizando o *A. vinelandii* e o melação de cana-de-açúcar como fonte de carbono.

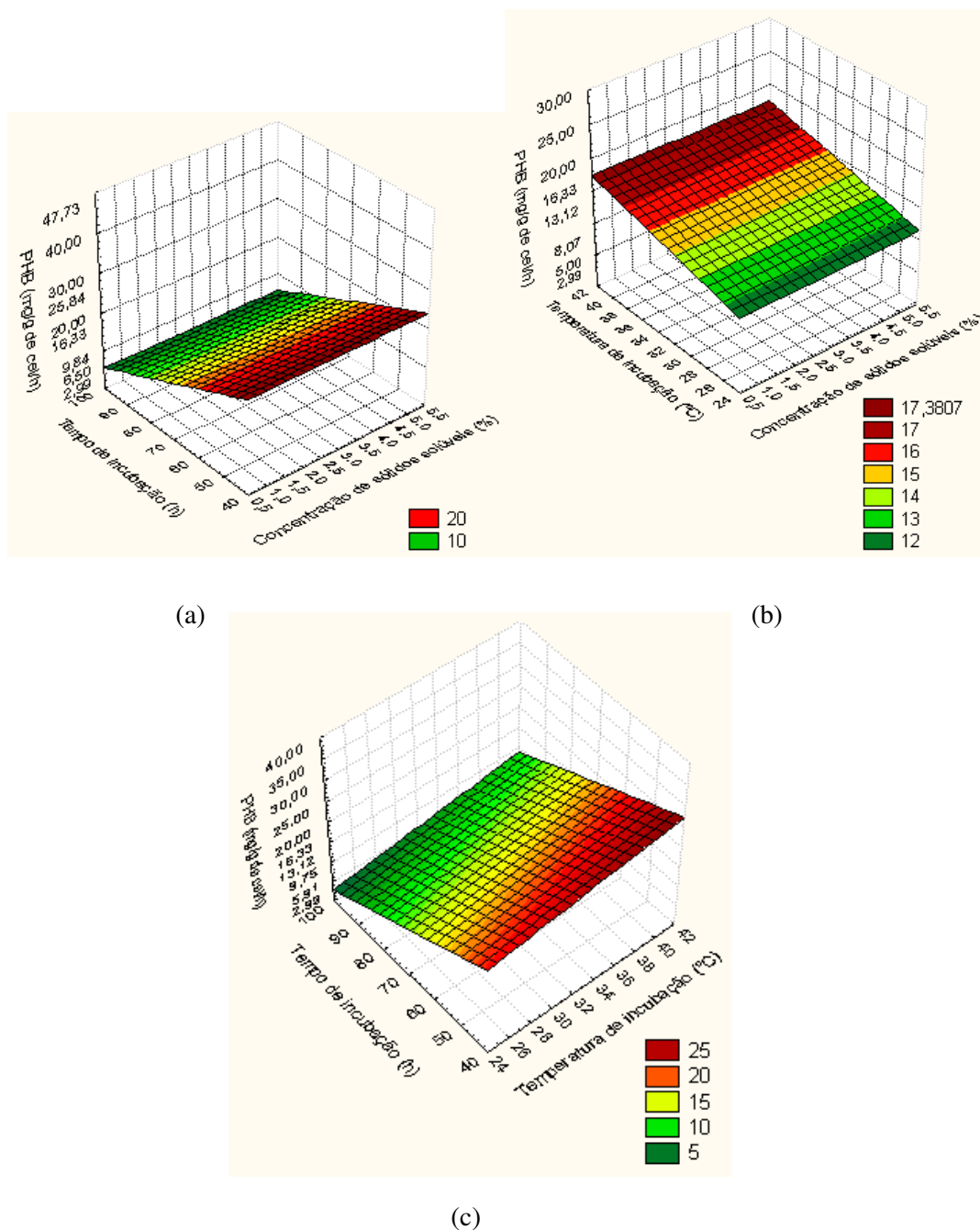


Figura 34. Superfícies de resposta para: (a) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e tempo de incubação (h) (equação: $36,43-0,0053*x-0,31*y$); (b) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) (equação: $3,57-0,0053*x+0,33*y$); (c) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) e tempo de incubação (h) (equação: $25,73+0,33*x-0,31*y$).

O PHB extraído apresentou pureza entre 93,0 e 95,0% (Tabela 14).

Tabela 14. Valores de Pureza do PHB para o primeiro experimento com o melaço de cana-de-açúcar (2^{6-2})

Ensaio	Concentração teste de PHB ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância 235 nm	Concentração determinada ($\mu\text{g/mL}$)	% Pureza
1	5,00	0,6900	4,65	93,0
2	5,00	0,7052	4,73	94,6
3	5,00	0,7054	4,73	94,7
4	5,00	0,6987	4,70	93,9
5	5,00	0,6931	4,67	93,4
6	5,00	0,6945	4,68	93,5
7	5,00	0,7021	4,72	94,3
8	5,00	0,7065	4,74	94,8
9	5,00	0,7024	4,72	94,3
10	5,00	0,7036	4,72	94,5
11	5,00	0,7089	4,75	95,0
12	5,00	0,7056	4,73	94,7
13	5,00	0,7088	4,75	95,0
14	5,00	0,6988	4,70	94,0
15	5,00	0,6971	4,69	93,8
16	5,00	0,6954	4,68	93,6
17	5,00	0,6973	4,69	93,8
18	5,00	0,6987	4,70	93,9

5.4.2. Segundo Planejamento Experimental

O segundo planejamento experimental para o melaço de cana-de-açúcar foi realizado com base nos gráficos de perfil para predição de valores e desejabilidade da produtividade do PHB (“Profiles for predicted values and desirability”) do primeiro planejamento experimental com o auxílio do software Statística 6.0 (Figura 35).

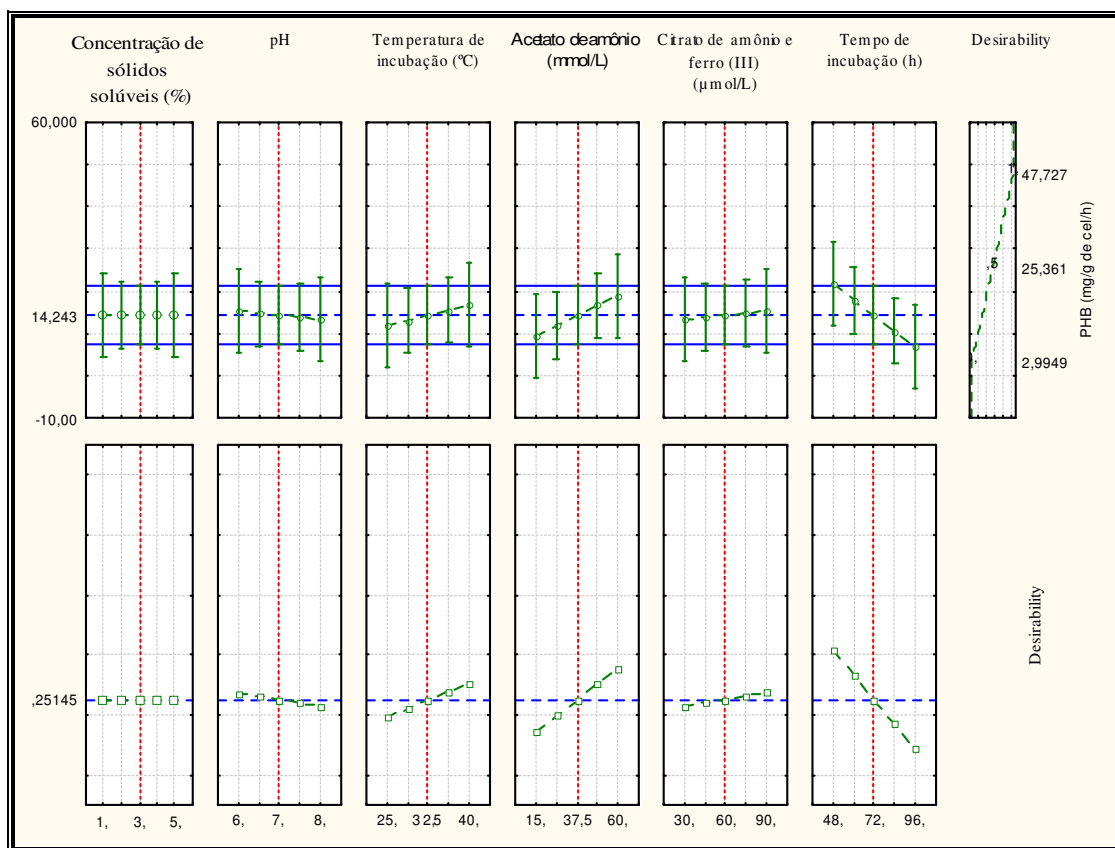


Figura 35. Perfil para predição de valores e desejabilidade (“Profiles for predicted values and desirability”) do primeiro planejamento experimental para o melaço de cana-de-açúcar.

Na Figura 35 pode-se observar que conforme se diminui o pH e o tempo de incubação aumenta-se a produtividade do PHB; já aumentando a temperatura de incubação, a concentração de acetato de amônio e a concentração de citrato de amônio e ferro (III) também aumenta-se a produtividade do PHB, enquanto a concentração de sólidos solúveis não influenciou na produtividade deste composto. Dessa forma, utilizou-se estes resultados e os valores de significância ($p < 0,05$) para configurar o segundo planejamento experimental (item 4.4., Tabela 5).

No segundo planejamento experimental para o melaço de cana-de-açúcar pode-se observar na análise de variância (ANOVA), realizada com o auxílio do software Statística 6.0, que todas as variáveis independentes estudadas apresentaram significância estatística ($p < 0,05$) no crescimento bacteriano (Tabela 15).

Tabela 15. Planejamento experimental fatorial completo 3^{3-0} com duas repetições no ponto central para o melaço de cana-de-açúcar utilizado no estudo da biomassa, PHB e alginato com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ($\rho < 0,05$)

Ensaio	X1 Concentração de sólidos solúveis (%)	X2 Temperatura de incubação (°C)	X3 Tempo de incubação (h)	Biomassa (mg/mL) • $\rho = X1; X2; X3$	PHB (mg/g de cél/h) • $\rho = X2; X3$	Alginato (mg/g de cél/h) • $\rho = X1; X2$
1	5	40	12	2,35	15,85	173,81
2	5	40	30	2,68	30,61	107,58
3	5	40	48	2,97	2,26	26,15
4	5	50	12	1,98	19,88	192,70
5	5	50	30	2,04	17,62	142,60
6	5	50	48	2,23	1,59	37,39
7	5	60	12	0,96	61,32	462,32
8	5	60	30	1,16	31,59	221,36
9	5	60	48	1,15	12,81	120,49
10	15	40	12	1,89	114,97	162,57
11	15	40	30	3,47	18,16	0,00
12	15	40	48	4,17	1,71	0,00
13	15	50	12	1,90	22,92	0,00
14	15	50	30	1,74	26,89	0,00
15	15	50	48	2,33	2,19	131,55
16	15	60	12	2,05	119,07	0,00
17	15	60	30	1,77	4,11	325,58
18	15	60	48	2,23	49,36	32,64
19	25	40	12	2,63	26,61	0,00
20	25	40	30	2,64	5,52	0,00
21	25	40	48	3,02	2,71	0,00
22	25	50	12	1,89	118,22	0,00
23	25	50	30	2,81	18,21	0,00
24	25	50	48	3,00	4,82	0,00
25	25	60	12	2,52	108,68	0,00
26	25	60	30	0,96	96,38	0,00
27	25	60	48	3,01	4,29	0,00
28*	15	50	30	2,08	53,42	210,33
29*	15	50	30	1,98	0,00	82,36

* Pontos centrais.

• ρ = variável independente significativa estatisticamente ($\rho < 0,05$).

Com o segundo planejamento experimental (3^{3-0}) utilizando como variáveis independentes a concentração de sólidos solúveis, a temperatura e o tempo de incubação foi possível comprovar que o aumento da biomassa ($2,8 - 3,6 \text{ mg mL}^{-1}$) foi acompanhado pelo aumento da concentração de sólidos solúveis (12 – 26 %). Como observado no primeiro planejamento experimental o crescimento bacteriano foi acentuado na menor temperatura de

incubação testada (38 – 40°C) e no maior tempo de incubação avaliado (45 – 50 h) (Figura 36).

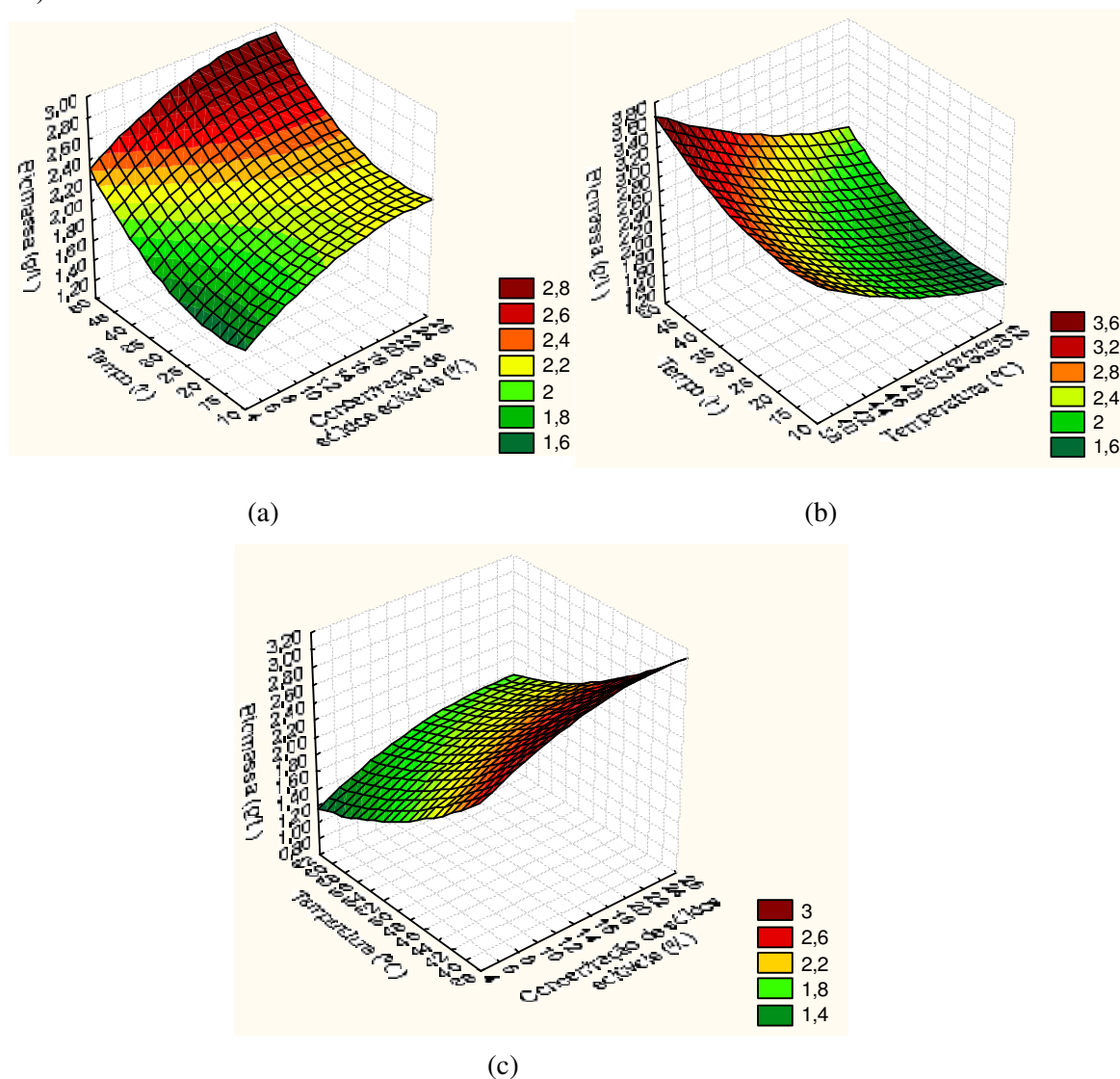
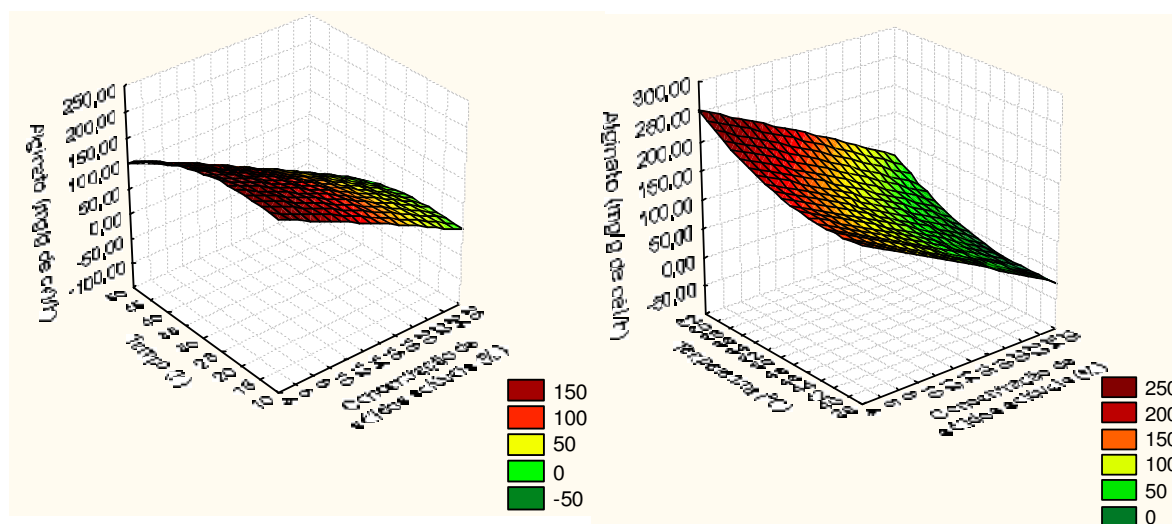


Figura 36. (a) Superfícies de resposta para a biomassa (mg/mL) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e tempo de incubação (h) (equação: $7,32+0,072*x-0,0015*x^2-0,025*y+0,00072*y^2-5,83$); (b) Superfícies de resposta para a biomassa (mg/mL) ao redor dos valores ótimos de temperatura de incubação (°C) e tempo de incubação (h) (equação: $7,32-0,18*x+0,0012*x^2-0,025*y+0,00072*y^2+0,75$); (c) Superfícies de resposta para a biomassa (mg/mL) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e temperatura de incubação (°C) (equação: $7,32+0,072*x-0,0015*x^2-0,18*y+0,0012*y^2-0,096$).

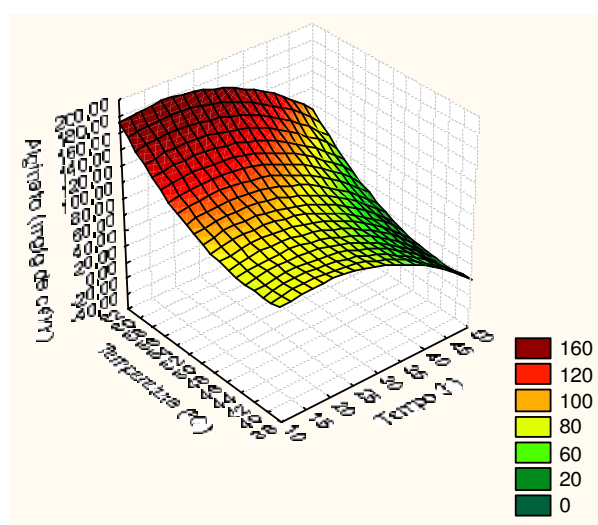
Durante o estudo da produtividade de alginato (valor máximo entre 200 – 250 mg/g de célula/h) pode-se observar que a concentração ótima de sólidos solúveis foi entre 4,0 e 8,0%, fato coerente com o comportamento do primeiro experimento para o melão, no qual a

concentração ideal foi de 4,5 - 5,5%. A temperatura ideal foi entre 58 – 62 °C, ou seja, em temperaturas de incubação elevadas e no menor tempo de incubação (10 – 40 h) ocorreu a maior síntese de alginato como mostra a Figura 37.



(a)

(b)



(c)

Figura 37. Superfícies de resposta para: (a) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e tempo de incubação (h) (equação: $544,83-7,40*x-0,028*x^2+3,01*y-0,083*y^2-354,12$); (b) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e temperatura de incubação (°C) (equação: $544,83-7,40*x-0,028*x^2-18,01*y+0,22*y^2+15,33$); (c) produtividade de alginato (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e temperatura de incubação (°C) (equação: $544,83-18,01*y+,218*y^2+3,01*x-0,083*x^2-117,34$).

Na Figura 38 observa-se um aumento na produtividade do PHB de 27 para 100 mg/g de célula/h do primeiro para o segundo planejamento experimental para o melaço e foi possível notar que a concentração de sólidos solúveis ideal foi na faixa entre 12 – 26%, na maior temperatura de incubação (60 – 62°C) e no menor tempo de incubação (10 – 15 h).

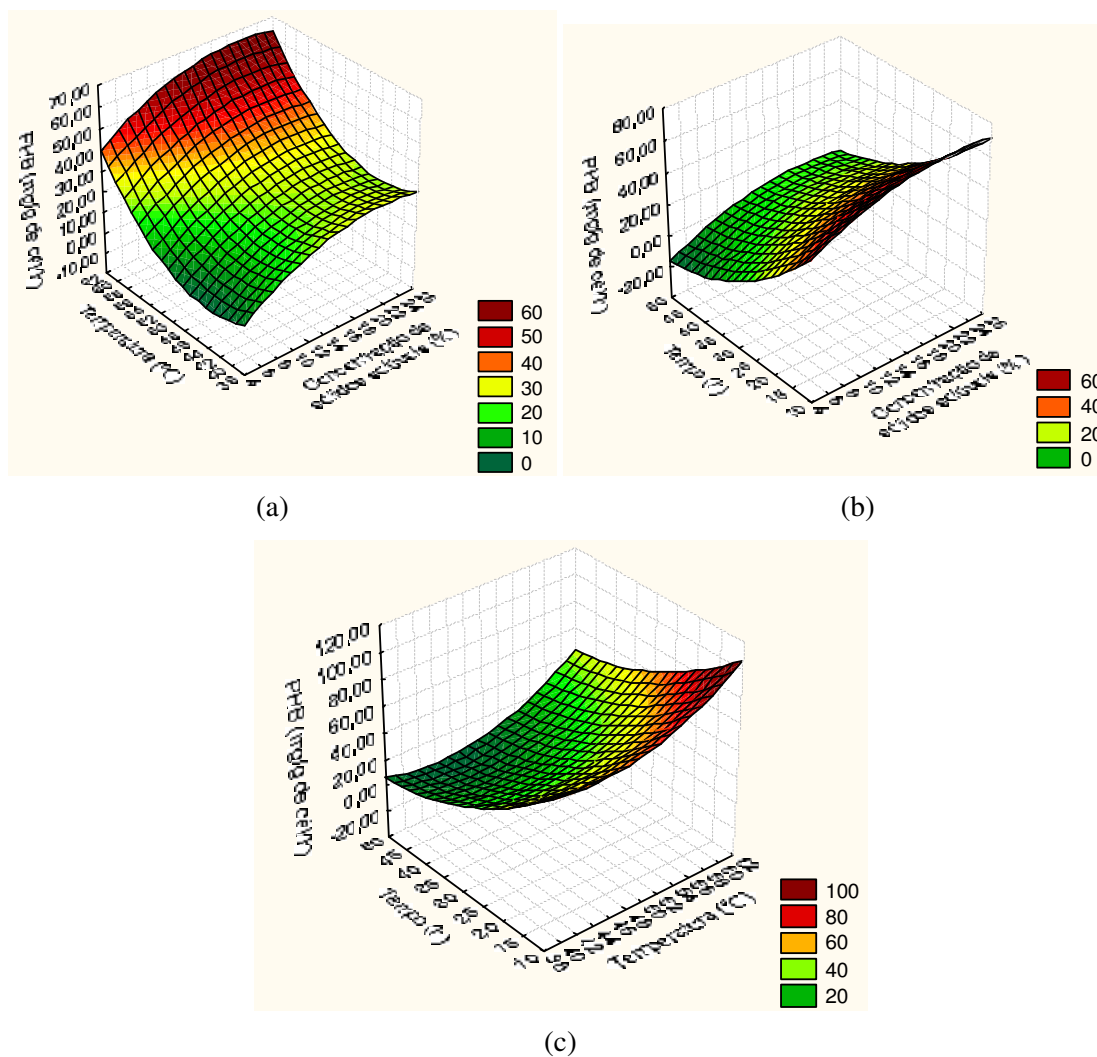


Figura 38. Superfícies de resposta para: (a) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e temperatura de incubação (°C) (equação: $317,71+3,52*x-0,082*x^2-11,50*y+0,13*y^2-77,04$); (b) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de concentração de sólidos solúveis (%) e tempo de incubação (h) (equação: $317,71+3,52*x-0,082*x^2-3,52*y+0,032*y^2-250,19$); (c) produtividade de PHB (mg/g de célula/h) ao redor dos valores ótimos de temperatura de incubação (°C) e tempo de incubação (h) (equação: $317,71-11,50*x+0,13*x^2-3,51*y+0,031*y^2+34,39$).

O PHB extraído apresentou pureza entre 93,4 e 95,1% (Tabela 16).

Tabela 16. Valores de Pureza do PHB para o segundo experimento com o melaço de cana-de-açúcar (3^{3-0})

Ensaio	Concentração teste de PHB ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância 235 nm	Concentração determinada ($\mu\text{g/mL}$)	% Pureza
1	5,00	0,7056	4,73	94,7
2	5,00	0,7088	4,75	95,0
3	5,00	0,7096	4,75	95,1
4	5,00	0,6958	4,68	93,6
5	5,00	0,6955	4,68	93,6
6	5,00	0,6933	4,67	93,4
7	5,00	0,6984	4,70	93,9
8	5,00	0,6947	4,68	93,5
9	5,00	0,6987	4,70	93,9
10	5,00	0,7012	4,71	94,2
11	5,00	0,7059	4,74	94,7
12	5,00	0,7060	4,74	94,7
13	5,00	0,7023	4,72	94,3
14	5,00	0,7054	4,73	94,7
15	5,00	0,7023	4,72	94,3
16	5,00	0,7099	4,76	95,1
17	5,00	0,6988	4,70	94,0
18	5,00	0,6987	4,70	93,9
19	5,00	0,7012	4,71	94,2
20	5,00	0,6987	4,70	93,9
21	5,00	0,7012	4,71	94,2
22	5,00	0,6933	4,67	93,4
23	5,00	0,7012	4,71	94,2
24	5,00	0,7033	4,72	94,4
25	5,00	0,7056	4,73	94,7
26	5,00	0,6987	4,70	93,9
27	5,00	0,6931	4,67	93,4
28	5,00	0,6945	4,68	93,5
29	5,00	0,6987	4,70	93,9

5.5. PRODUÇÃO DE PHB E ALGINATO NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS PARA O MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

A produção de PHB foi realizada com treze frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio de cultura com melaço de cana-de-açúcar sob as mesmas condições: pH = 6, tempo de incubação de 14 h, temperatura de incubação de 60,0°C e na concentração de sólidos solúveis de 19,0%.

Nestas condições otimizadas observou-se que a biomassa foi de $2,55 \pm 0,15$ mg/mL, a produtividade do PHB foi de $92,07 \pm 10,17$ mg/g de célula/h e a produtividade do alginato de $252,31 \pm 9,09$ mg/g de célula/h. O valor de produtividade do PHB, utilizando o melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono, foi maior que o valor descrito na literatura por Quagliano e colaboradores (2001), utilizando esta mesma fonte de carbono (produtividade do PHB = 16 mg/g de célula/h).

5.6. EFEITO DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NAS PRODUÇÕES DE PHB E ALGINATO COM SACAROSE, GLICOSE E MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Durante a utilização de sacarose como fonte de carbono nas concentrações testadas (10,0; 30,0 e 50,0 g L⁻¹) foi observado que a produtividade de PHB foi maior em baixas concentrações (10,0 g L⁻¹), fato comprovado com o 2º planejamento experimental no qual a melhor concentração foi de 10 g L⁻¹. Já para o alginato a produtividade foi maior em elevadas concentrações de sacarose (55,0 g L⁻¹).

A produtividade do alginato utilizando glicose como fonte de carbono foi maior na concentração máxima (68,0 e 72,0 g L⁻¹) e para o PHB entre 48,0 – 68,0 g L⁻¹.

A produtividade do alginato utilizando melaço como fonte de carbono foi maior na concentração de sólidos solúveis entre 4,0 e 8,0%. Já a produtividade do PHB foi elevada entre 12,0 – 26,0% de sólidos solúveis.

Outro fato observado para a sacarose e a glicose, como fontes de carbono, foi que conforme a biomassa aumentava diminuía-se a produtividade do PHB. Isto provavelmente está relacionado com o tempo de incubação, já que o crescimento bacteriano foi favorecido com o decorrer do tempo (96 h) e a produtividade de PHB e alginato foi favorecida com o menor tempo de incubação (aproximadamente 12 h). A elevada produtividade destes compostos nas primeiras horas deve-se, provavelmente, ao estresse em que a *Azotobacter vinelandii* foi submetida, pois neste período estaria ocorrendo a adaptação das células no meio de fermentação (meio mínimo adicionado da fonte de carbono), já que anteriormente a bactéria encontrava-se em um meio nutricionalmente mais complexo (pré-fermentação em caldo nutriente). Com esta mudança de ambiente possivelmente houve o favorecimento da biossíntese de ambos os compostos; um como mecanismo de defesa ao ambiente e o outro como reserva energética.

Quanto ao pH, o menor valor (pH = 6) foi favorável para a produtividade do PHB e do alginato quando foi utilizada a sacarose e o melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono. Já para a glicose como fonte de carbono o pH igual a 8 favoreceu a produtividade do PHB, enquanto para o alginato o pH ideal foi igual a 6, assim como para a sacarose e o melaço de cana-de-açúcar.

Com a utilização de sacarose como substrato foi observado que a adição de acetato $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (a concentração mais baixa) favoreceu a produtividade do PHB e alginato. Já para a glicose a produção de alginato também foi maior na concentração de $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$, mas a produtividade do PHB foi maior na concentração mais elevada, $60,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Entretanto, para o melaço de cana-de-açúcar a concentração elevada, $60,0 \text{ mmol L}^{-1}$, favoreceu a produtividade de ambos os compostos.

A adição de $90,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de citrato de amônio e ferro (III), a maior concentração testada, favoreceu o aumento da produtividade do PHB e alginato quando utilizou-se a sacarose como fonte de carbono. Entretanto, para a glicose a produtividade do PHB foi maior quando em baixa concentração de citrato de amônio e ferro (III), $30,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, e para o alginato a concentração ideal foi a mais elevada, $90,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. No melaço de cana-de-açúcar foi observado um efeito contrário ao descrito para a glicose, pois a produtividade do PHB e alginato foi maior nas concentrações de $90,0$ e $30,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Em geral, observou-se uma maior produtividade do PHB e alginato quando a concentração de acetato de amônio e ferro (III) era a máxima testada e, conseqüentemente a concentração de citrato de amônio melhor para obter a maior produção devia ser a mínima testada ou vice-versa. Somente foram testados estes dois sais pelo fato de existirem relatos na literatura do aumento na produção de PHB quando adicionados ao meio de fermentação. A relação entre as concentrações destes sais observada neste experimento pode ser explicada com base na biossíntese do PHB e alginato, pois embora os sais individualmente possam favorecer a produção, quando utilizados concomitantemente pode ocorrer um efeito antagônico na utilização destes compostos pela bactéria. Desse modo, quando se utiliza uma concentração elevada de um dos sais é necessário utilizar uma concentração mais baixa do outro.

6. CONCLUSÕES

O crescimento bacteriano (1,00 – 5,00 mg/mL) foi favorecido com o decorrer do tempo de incubação (96 h).

A maior produtividade de PHB (100 mg/g de célula/h) foi atingida utilizando o melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono com um tempo de incubação de aproximadamente 10 h, a 60,0°C e nas concentrações de sólidos solúveis entre 14,0 – 25,0%. Em seguida, a maior produtividade de PHB foi com a glicose (60 mg/g de célula/h) no tempo de incubação de aproximadamente 10 h, entre 23,0-26,0°C e concentração de glicose entre 48,0 e 62,0 g/L. Por fim, a maior produtividade de PHB foi com a sacarose como fonte de carbono (45 mg/g de célula/h) no tempo de incubação de aproximadamente 18 h, a 60,0°C e concentração de sacarose de 10,0 g/L.

Já a produtividade do alginato foi mais expressiva (6000 mg/g de célula/h) para a glicose como fonte de carbono no tempo de incubação de aproximadamente 10 h, na temperatura de 25,0°C e na concentração de glicose entre 70,0 – 72,0 g/L. Em seguida, a produtividade do alginato foi maior utilizando a sacarose (1600 mg/g de célula/h) no tempo de incubação de aproximadamente 18 h, entre 60,0 – 62,0 °C e na concentração de 10,0 g/L. Por fim, o melaço de cana-de-açúcar (250 mg/g de célula/h) no tempo de incubação de 10 h, a 60,0°C e na concentração de sólidos solúveis entre 4,0 – 6,0%.

Dessa forma, a glicose mostrou-se como a fonte de carbono mais promissora para a produção do alginato e o melaço de cana-de-açúcar para a produção do PHB.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, M. G. E.; EIROA, M.; TORRES, C., NUNES, B. R.; REIS, M. A. M. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. **Journal of Biotechnology**, v. 130, p. 411-421, 2007.

ALI, A. Q.; KANNAN, T. P.; AHMAD, A.; SAMSUDIN, A. R. *In vitro* genotoxicity tests for polyhydroxybutyrate – A synthetic biomaterial. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 57-67, 2008.

ALKAWASH, M. A.; SOOTHILL, J. S.; SCHILLER, N. L. Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. **APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 114, p. 131-138, 2006.

ALLMAN, R.; HANN, A. C.; PHILLIPS, A. P.; MARTIN, K. L.; LLOYDE, D. Growth of *Azotobacter vinelandii* with correlation of Coulter size flow cytometric parameters, and ultrastructure. **Cytometry**, v.11, p. 822-831, 1990.

ALMEIDA, A.; RUIZ, J. A.; LÓPEZ, N. I.; PETTINARI, M. J. Bioplásticos - uma alternativa ecológica. **Revista Química Viva**, v. 3, p. 122-133, 2004.

ARAÚJO, D. G. Produção de Poli [3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato] por *Escherichia coli* recombinante a partir de Glicose e Ácido Propiônico. 2005. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 2005.

BOOMA, M.; SELKE, S. E.; GIACIN, J. R. Degradable Plastics. **Journal of Elastomers and Plastics**, v. 26, p. 104-142, 1994.

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

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources - Physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 65, p. 127–161, 1998.

BRIVONESE, A. C.; SUTHERLAND, I. W. Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 97-101, 1989.

BURNS, K. L.; OLDHAM, C. D.; THOMPSON, J. R.; LUBARSKY, M.; MAY, S. W. Analysis of the *in vitro* biocatalytic production of poly-(β)-hydroxybutyric acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 591–599, 2007.

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

CHEN, W.; CHEN, J.; CHANG, S.; SU, C. Bacterial alginate produced by a mutant of *Azotobacter vinelandii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, p. 543-546, 1985.

CHO, K. S.; RYU, H. W.; PARK, C. H.; GOODRICH, P. R. Utilization of swine wastewater as a feedstock for the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, p. 129-133, 2001.

CLEMENTI, F.; FANTOZZI, P.; MANCINI, F.; MORESI, M. Optimal conditions for alginate production by *Azotobacter vinelandii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 983-988, 1995.

CLEMENTI, F. Alginate Production by *Azotobacter vinelandii*. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, p. 327-361, 1997.

CLEMENTI, F.; CRUDELE, M. A.; PARENTE, E.; MANCINI, M.; MORESI, M. Production and characterization of alginate from *Azotobacter vinelandii*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 602-610, 1999.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis - uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, v. 29, p. 811-816, 2006.

GACESA, P.; RUSSELL, N. J. The structure and property of alginate. In: **_. Pseudomonas infection and alginates**. London: Chapman & Hall, 1990, p. 29-49.

GALDÁMEZ, E. V. C. Aplicações das técnicas de planejamento e análise de experimentos na melhoria da qualidade de um processo de fabricação de produtos plásticos. 2002. 133 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia da Produção) - Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil, 2002.

GAONA, G.; NUNEZ, C.; GOLDBERG, J. B.; LINFORD, A. S.; NAJERA, R.; CASTANEDA, M.; GUZMAN, J.; ESPIN, G.; SOBERON-CHAVEZ, G. Characterization of the *Azotobacter vinelandii* algC gene involved in alginate and lipopolysaccharide production. **FEMS Microbiology Letters**, v. 238, p. 199-206, 2004.

GARCÍA, M. C. V.; LÓPEZ, M. J.; ELORRIETA, M. A.; SUÁREZ, F.; MORENO, J. Physiology of exopolysaccharide production by *Azotobacter vinelandii* from 4-hydroxybenzoic acid. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 29, p. 129-133, 2002.

GHATNEKAR, M. S.; PAI, J. S.; GANESH, M. Production and recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Methylobacterium* sp V49. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77, p. 444-448, 2002.

GLICKSMAN, M. Utilization of seaweed hydrocolloids in the food industry. **Hydrobiologia**, v. 151, p. 31-47, 1987.

GOMEZ, J. G. C.; BUENO-NETTO, C. L. Produção de poliésteres bacterianos. In: **Biotecnologia industrial - Processos Fermentativos e Enzimáticos**. 1^a. ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, v. 3, p. 219-245, 2001.

GOVAN, J. R. W.; HARRIS, G. S. *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis - unusual bacterial adaptation and pathogenesis. **Microbiology Science**, v. 3, p. 302-308, 1986.

HABA, E.; VIDAL-MAS, J.; BASSAS, M.; ESPUNY, M. J.; LLORENS, J.; MANRESA, A. Poly 3-(hydroxyalkanoates) produced from oily substrates by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (NCBIM 40044) - Effect of nutrients and incubation temperature on polymer composition. **Biochemical Engineering Journal**, v.35, p. 99-106, 2007.

HAHN, S. K.; CHANG, Y. K.; LEE, S. Y. Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 34-39, 1995.

HALAMI, P. M. Production of polyhydroxyalkanoate from starch by the native isolate *Bacillus cereus* CFR06. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 24, p. 805-812, 2008.

HEO, K.; YOON, J.; JIN, K. S.; JIN, S.; SATO, H.; OZAKI, Y.; SATKOWSKI, M. M.; NODA, I.; REE, M. Structural evolution in microbial polyesters. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, p. 4571-4582, 2008.

HORAN, N. J.; JARMAN, T. R.; DAWES, E. A. Studies of some enzymes of alginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. **Journal of General Microbiology**, v. 129, p. 2985-2990, 1983.

HRABAK, O. Industrial production of poly-b-hydroxybutyrate. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 103, p. 251-256, 1992.

KIM, B. S.; CHANG, H. N. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from starch by *Azotobacter chroococcum*. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 109-112, 1998.

LAFFERTY, R. M.; KORSATKO, B.; KORSATKO, W. Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid. In: **Biotechnology**. 1^a. ed. New York: VCH Publishers, 1988, p. 135-176.

LAW, J. H.; SLEPECKY, R. A. Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. **Journal of Bacteriology**, v. 82, p. 33-36, 1961.

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

LIN, L. P.; SADOFF, H. L. Encystment and polymer production by *Azotobacter vinelandii* in the presence of β -hydroxybutyrate. **Journal of Bacteriology**, v. 95, p. 2336-2343, 1968.

LUGG, H.; SAMMONS, R. L.; MARQUIS, P. M.; HEWITT, C. J.; YONG, P.; PATERSON-BEEDLE, M.; REDWOOD, M. D.; STAMBOULIS, A.; KASHANI, M.; JENKINS, M.; MACASKIE, L. E. Polyhydroxybutyrate accumulation by a *Serratia* sp. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 481-491, 2008.

MARTINSEN, A.; SKJÅK-BRÆK, G.; SMIDSRØD, O.; ZANETTI, F.; PAOLETTI, S. Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distributions of alginates. **Carbohydrate Polymers**, v. 15, p. 171-193, 1991.

MAY, T. B.; CHAKRABARTY, A. M. *Pseudomonas aeruginosa*: genes and enzymes of alginate synthesis. **Trends Microbiology**, v. 2, p. 151-157, 1994.

MISRA, S. K.; NAZHAT, S. N.; VALAPPIL, S. P.; MOSHREFI-TORBATI, M.; WOOD, R. J. K.; ROY, I.; BOCCACCINI, A. R. Fabrication and characterization of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate) composite containing bioglass. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 2112-2119, 2007.

MOEN, E.; LARSEN, B.; OSTGAARD, K.; JENSEN, A. Alginate stability during high salt preservation of *Ascophyllum nodosum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 11, p. 21-25, 1999.

MONTGOMERY, D. C. In: **Design and analysis of experiments**. 5^a. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method for determination of glucose. **Biochemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.

PAGE, W. J.; KNOSP, O. Hyperproduction of poly- β -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1334-1339, 1989.

PAGE, W. J.; MANCHAK, J.; RUDY, B. Formation of poly-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2866-2873, 1992.

PAGE, W. J.; CORNISH, A. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly- β -hydroxybutyrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 4236-4244, 1993.

PEÑA, C.; CAMPOS, N.; GALINDO, E. Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, p. 510-515, 1997.

POUTON, C. W.; AKHATAR, S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 18, p. 133-162, 1996.

PUNRATTANASIN, W. The utilization of activated sludge polyhydroxyalkanoates for the production of biodegradable plastics. 2001. 131 f. Tese (Doutorado em Filosofia em Ciência Ambiental e Engenharia) - Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, EUA, 2001.

QUAGLIANO, J. C.; AMARILLA, F.; FERNANDES, E. G.; MATA, D.; MIYAZAKI, S. S. Effect of simple and complex carbon sources, low temperature culture and complex carbon feeding policies on poly-3-hydroxybutyric acid (PHB) content and molecular weight (Mw) from *Azotobacter chroococcum* 6B. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 17, p. 9-14, 2001.

QUILLAGUAMÁN, J.; VAN-THUOC, D.; GUZMÁN, H.; GUZMÁN, D.; MARTÍN, J.; EVEREST, A.; HATTI-KAUL, R. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* in fed-batch culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 227-232, 2008.

SABRA, W.; ZENG, A. P.; DECKWER, W. D. Bacterial Alginate - physiology, product quality and process aspects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 315-325, 2001.

SADOFF, H. L. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. **Bacteriological Reviews**, v. 39, p. 516-539, 1975.

SAVALGI, V.; SAVALGI, V. Alginate production by *Azotobacter vinelandii* in batch culture. **Journal General Applied Microbiology**, v. 38, p. 641-645, 1992.

SEGURA, D.; CRUZ, T.; ESPIN, G. Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly-beta-hydroxybutyrate synthesis. **Archives of Microbiology**, v. 179, p. 437-443, 2003.

SHISHATSKAYA, E. I.; VOINOVA, O. N.; GOREVA, A. V.; MOGILNAYA, O. A.; VOLOVA, T. G. Biocompatibility of polyhydroxybutyrate microspheres - in vitro and in vivo evaluation. **Journal of Materials Science – Materials in Medicine**, v. 19, p. 2493-2502, 2008.

SMIDSRØD, O. Solution Properties of Alginate. **Carbohydrate Research**, v. 13, p. 359-372, 1970.

SMIDSRØD, O.; SKJÅK-BRÆK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **Trends in Biotechnology**, v. 8, p. 71-78, 1990.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, p. 19, 1952.

STEIGEDAL, M.; SLETTA, H.; MORENO, S.; MAERK, M.; CHRISTENSEN, B. E.; BJERKAN, T.; ELLINGSEN, T. E.; ESPIN, G.; ERTESVÅG, H.; VALLA, S. The *Azotobacter vinelandii* AlgE mannuronan C-5-epimerase family is essential for the in vivo control of alginate monomer composition and for functional cyst formation. **Environmental Microbiology**, v. 10, p. 1760-1770, 2008.

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

SURIYAMONGKOL, P.; WESELAKE, R.; NARINE, S.; MOLONEY, M.; SHAH, S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants – A review. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 148-175, 2007.

SUZUKI, D. V.; CARTER, J. M.; RODRIGUES, M. F. A.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E. Purification of polyhydroxybutyrate produced by *Burkholderia cepacia* IPT64 through a chemical and enzymatic route. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 24, p. 771-775, 2008.

TOKIWA, Y.; CALABIA, B. Biodegradability and biodegradation of polyesters. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 15, p. 259-267, 2007.

TRUJILLO-ROLDAN, M. A.; MORENO, S.; SEGURA, D.; GALINDO, E.; ESPIN, G. Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 733-737, 2003.

TSENG, M.; HOANG, K. C.; YANG, M. K.; YANG, S. F.; CHU, W. S. Polyester-degrading thermophilic actinomycetes isolated from different environment in Taiwan. **Biodegradation**, v. 18, p. 579-583, 2007.

VAN-THUOC, D.; QUILLAGUAMÁN, J.; MAMO, G.; MATTIASSON, B. Utilization of agricultural residues for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 420-428, 2008.

ZANZIG, J.; SCHOLZ, C. Effects of poly(ethylene glycol) on the production of poly(β -hydroxybutyrate) by *Azotobacter vinelandii* UWD. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 11, p. 145-154, 2003.

APÉNDICE

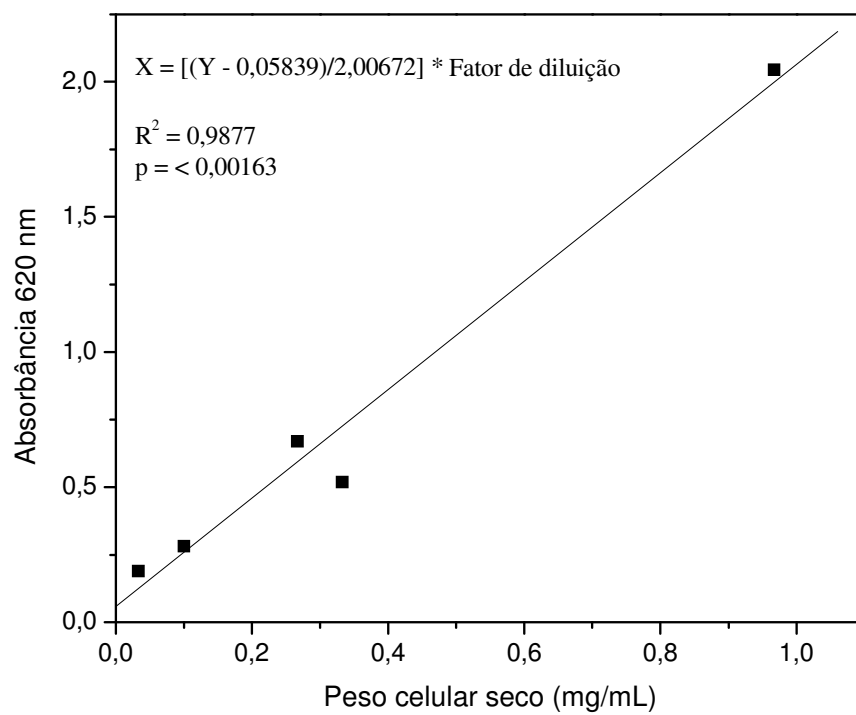


Figura 39. Curva de calibração para determinação da biomassa.

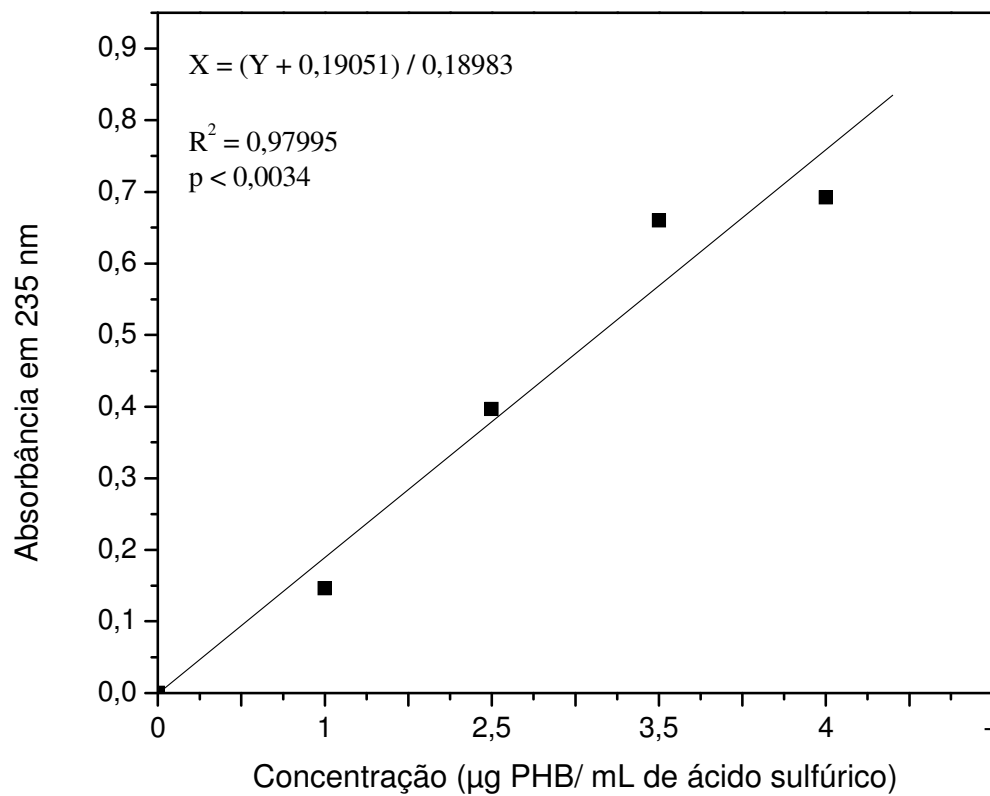


Figura 40. Curva de calibração para determinação de poli-hidroxibutirato (PHB) pelo método de Law e Slepecky (1961).

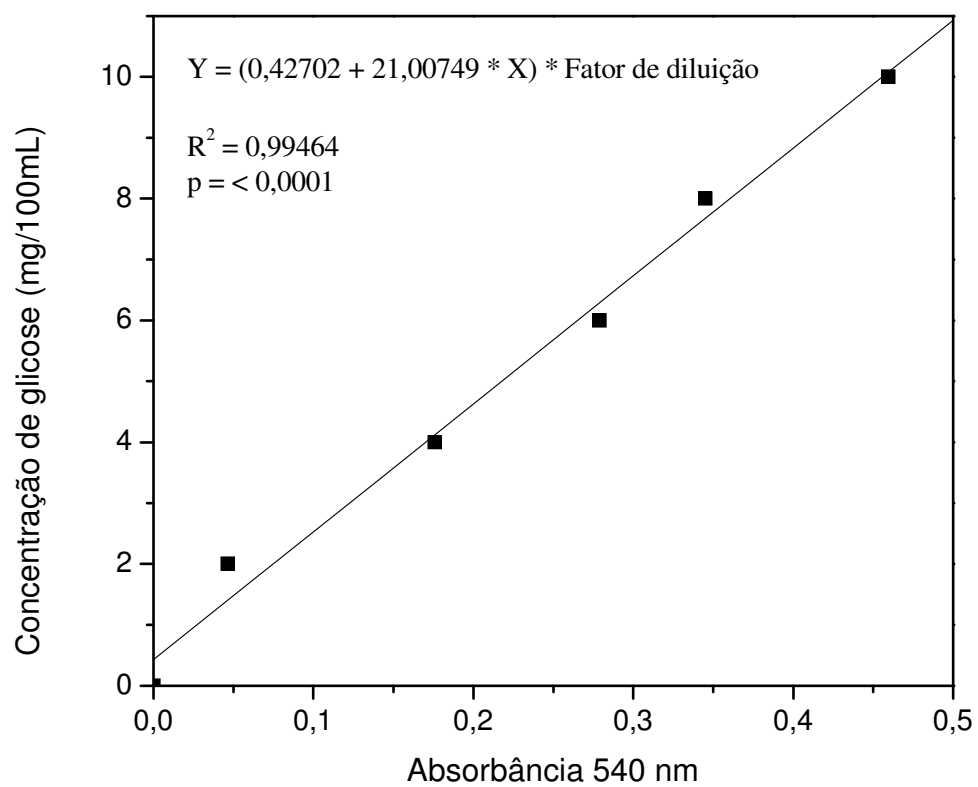


Figura 41. Curva de calibração para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi (1952) e Nelson (1944).

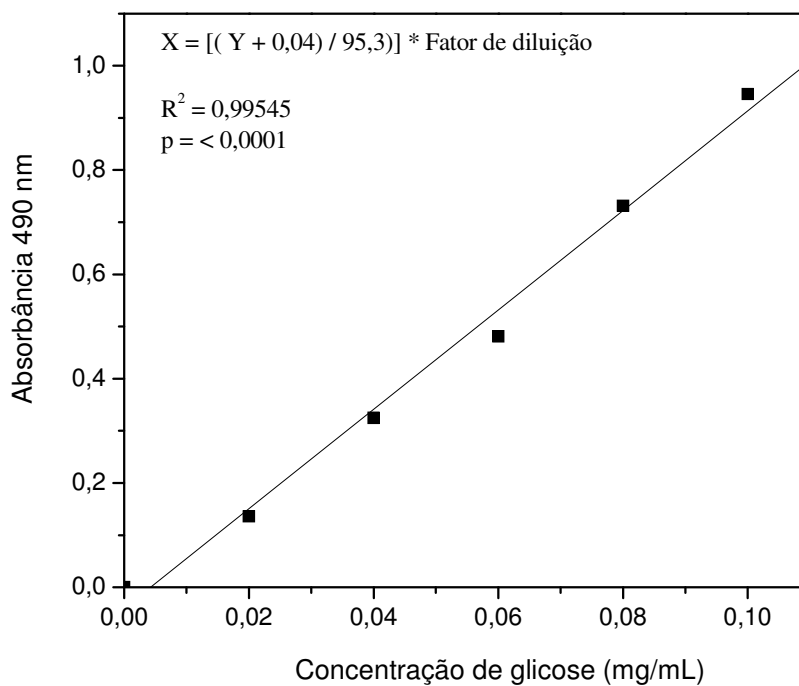


Figura 42. Curva de calibração para determinação de açúcares totais pelo método descrito por Dubois e colaboradores (1956).

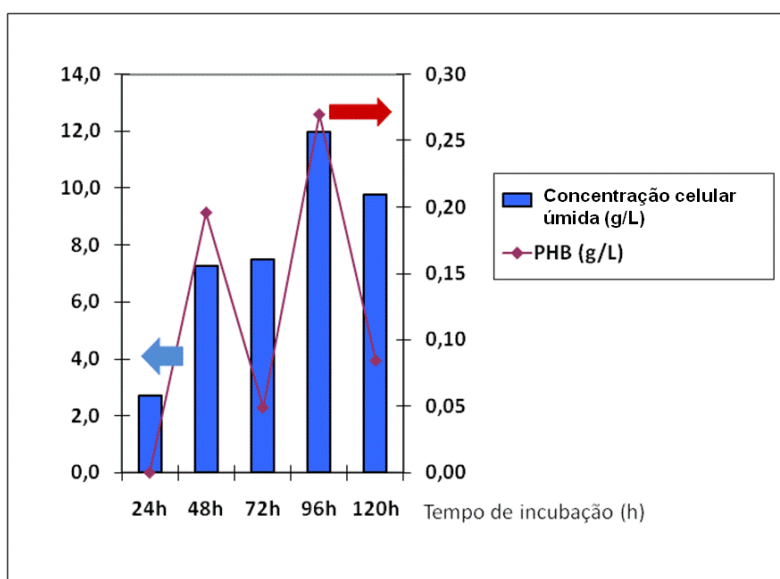


Figura 43. Relação entre o crescimento bacteriano e a produção de PHB com o tempo de incubação.

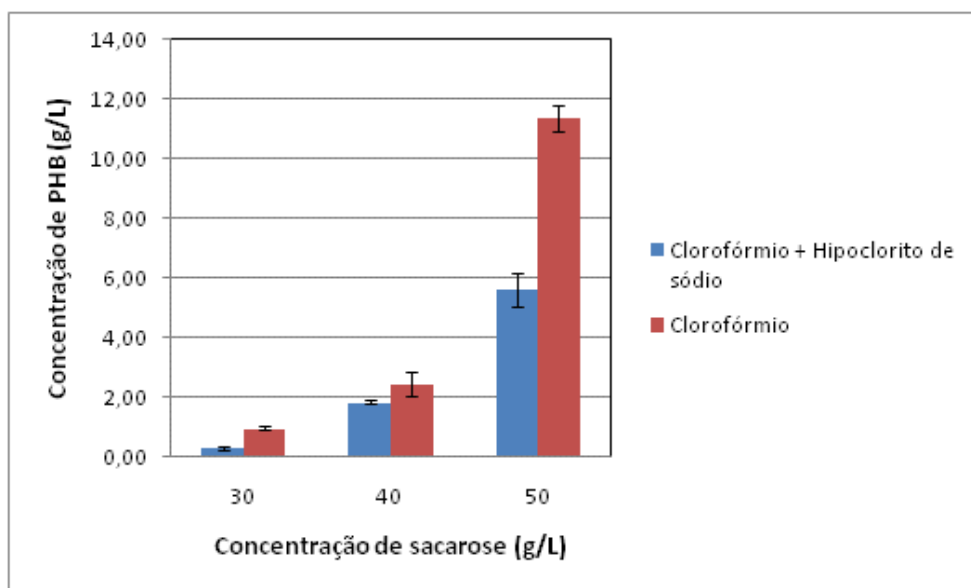


Figura 44. Comparação entre duas metodologias de extração do PHB intracelular, com os respectivos valores médios e desvio padrão.

Tabela 17. Resultados da análise de açúcares redutores, açúcares redutores e totais e, rendimento da biomassa, PHB e alginato com relação ao substrato utilizado para o segundo planejamento experimental (3^{3-0}) com a sacarose.

Ensaio	Tempo de incubação (h)	Substrato inicial* (g/L)	Açúcares redutores (g/L)	Açúcares redutores e totais (g/L)	Substrato consumido (g/L)	Substrato consumido (%)
1	18	2,00	0,10	0,45	1,55	77,50
2	33	2,00	0,08	0,36	1,64	82,00
3	48	2,00	0,09	0,98	1,02	51,00
4	18	2,00	0,11	0,54	1,46	73,00
5	33	2,00	0,12	0,63	1,37	68,50
6	48	2,00	0,10	0,98	1,02	51,00
7	18	2,00	0,07	0,78	1,22	61,00
8	33	2,00	0,08	0,69	1,31	65,50
9	48	2,00	0,12	0,39	1,61	80,50
10	18	6,00	0,14	0,58	5,42	90,33
11	33	6,00	0,16	0,47	5,53	92,17
12	48	6,00	0,20	0,69	5,31	88,50
13	18	6,00	0,15	0,55	5,45	90,83
14	33	6,00	0,08	0,98	5,02	83,67
15	48	6,00	0,09	0,89	5,11	85,17
16	18	6,00	0,10	0,96	5,04	84,00
17	33	6,00	0,15	0,36	5,64	94,00
18	48	6,00	0,20	0,58	5,42	90,33
19	18	10,00	0,15	0,63	9,37	93,70
20	33	10,00	0,10	0,69	9,31	93,10
21	48	10,00	0,14	0,58	9,42	94,20
22	18	10,00	0,20	0,78	9,22	92,20
23	33	10,00	0,35	0,66	9,34	93,40
24	48	10,00	0,40	0,73	9,27	92,70
25	18	10,00	0,25	0,59	9,41	94,10
26	33	10,00	0,20	0,48	9,52	95,20
27	48	10,00	0,36	0,99	9,01	90,10
28	18	2,00	0,09	0,58	1,42	71,00
29	33	2,00	0,10	0,98	1,02	51,00
30	48	2,00	0,09	0,78	1,22	61,00
31	18	2,00	0,10	0,45	1,55	77,50
32	33	2,00	0,10	0,36	1,64	82,00
33	48	2,00	0,08	0,98	1,02	51,00
34	18	2,00	0,09	0,54	1,46	73,00
35	33	2,00	0,11	0,63	1,37	68,50
36	48	2,00	0,12	0,98	1,02	51,00
37	18	6,00	0,10	0,78	5,22	87,00
38	33	6,00	0,07	0,69	5,31	88,50
39	48	6,00	0,08	0,39	5,61	93,50
40	18	6,00	0,12	0,58	5,42	90,33
41	33	6,00	0,14	0,47	5,53	92,17
42	48	6,00	0,16	0,69	5,31	88,50
43	18	6,00	0,20	0,55	5,45	90,83
44	33	6,00	0,15	0,98	5,02	83,67
45	48	6,00	0,08	0,89	5,11	85,17

Continuação

Ensaio	Tempo de incubação (h)	Substrato inicial* (g/L)	Açúcares redutores (g/L)	Açúcares redutores e totais (g/L)	Substrato consumido (g/L)	Substrato consumido (%)
46	18	10,00	0,09	0,96	9,04	90,40
47	33	10,00	0,10	0,36	9,64	96,40
48	48	10,00	0,15	0,58	9,42	94,20
49	18	10,00	0,20	0,63	9,37	93,70
50	33	10,00	0,15	0,69	9,31	93,10
51	48	10,00	0,10	0,58	9,42	94,20
52	18	10,00	0,14	0,78	9,22	92,20
53	33	10,00	0,20	0,66	9,34	93,40
54	48	10,00	0,35	0,73	9,27	92,70
55	18	2,00	0,40	0,59	1,41	70,50
56	33	2,00	0,25	0,48	1,52	76,00
57	48	2,00	0,20	0,99	1,01	50,50
58	18	2,00	0,36	0,58	1,42	71,00
59	33	2,00	0,09	0,98	1,02	51,00
60	48	2,00	0,10	0,78	1,22	61,00
61	18	2,00	0,09	0,45	1,55	77,50
62	33	2,00	0,10	0,36	1,64	82,00
63	48	2,00	0,10	0,98	1,02	51,00
64	18	6,00	0,08	0,54	5,46	91,00
65	33	6,00	0,09	0,63	5,37	89,50
66	48	6,00	0,11	0,98	5,02	83,67
67	18	6,00	0,12	0,78	5,22	87,00
68	33	6,00	0,10	0,69	5,31	88,50
69	48	6,00	0,07	0,39	5,61	93,50
70	18	6,00	0,08	0,58	5,42	90,33
71	33	6,00	0,12	0,47	5,53	92,17
72	48	6,00	0,14	0,69	5,31	88,50
73	18	10,00	0,16	0,55	9,45	94,50
74	33	10,00	0,20	0,98	9,02	90,20
75	48	10,00	0,15	0,89	9,11	91,10
76	18	10,00	0,08	0,96	9,04	90,40
77	33	10,00	0,09	0,36	9,64	96,40
78	48	10,00	0,10	0,58	9,42	94,20
79	18	10,00	0,15	0,63	9,37	93,70
80	33	10,00	0,20	0,69	9,31	93,10
81	48	10,00	0,15	0,58	9,42	94,20

*Substrato inicial = sacarose

Tabela 18. Resultados da análise de açúcares redutores, açúcares redutores e totais e, rendimento da biomassa, PHB e alginato com relação ao substrato utilizado para o segundo planejamento experimental (3^{3-0}) com a glicose

Ensaio	Tempo de incubação (h)	Substrato inicial* (g/L)	Açúcares redutores (g/L)	Açúcares redutores e totais (g/L)	Substrato consumido (g/L)	Substrato consumido (%)
1	12	50,00	0,45	2,14	47,86	95,72
2	30	50,00	0,36	1,80	48,20	96,40
3	48	50,00	0,98	1,61	48,39	96,78
4	12	50,00	0,54	2,16	47,84	95,68
5	30	50,00	0,63	1,75	48,25	96,50
6	48	50,00	0,98	1,87	48,13	96,26
7	12	50,00	0,78	1,71	48,29	96,58
8	30	50,00	0,69	2,14	47,86	95,72
9	48	50,00	0,39	1,88	48,12	96,24
10	12	60,00	0,58	1,95	58,05	96,75
11	30	60,00	0,47	2,18	57,82	96,37
12	48	60,00	0,69	2,01	57,99	96,65
13	12	60,00	0,55	1,88	58,12	96,87
14	30	60,00	0,98	2,02	57,98	96,63
15	48	60,00	0,89	2,16	57,84	96,40
16	12	60,00	0,96	2,09	57,91	96,52
17	30	60,00	0,36	1,93	58,07	96,78
18	48	60,00	0,58	2,09	57,91	96,52
19	12	70,00	0,63	1,55	68,45	97,79
20	30	70,00	0,69	1,88	68,12	97,31
21	48	70,00	0,58	1,86	68,14	97,34
22	12	70,00	0,78	1,89	68,11	97,30
23	30	70,00	0,66	1,92	68,08	97,26
24	48	70,00	0,73	1,95	68,05	97,21
25	12	70,00	0,59	1,91	68,09	97,27
26	30	70,00	0,48	1,83	68,17	97,39
27	48	70,00	0,99	2,09	67,91	97,01
28	30	60,00	0,58	2,10	57,90	96,50
29	30	60,00	0,98	2,10	57,90	96,50
30	30	60,00	0,78	2,10	57,90	96,50

*Substrato inicial = glicose

Tabela 19. Resultados da análise de açúcares redutores, açúcares redutores e totais e, rendimento da biomassa, PHB e alginato com relação ao substrato utilizado para o segundo planejamento experimental (3^{3-0}) com o melaço de cana-de-açúcar

Ensaio	Tempo de incubação (h)	Substrato inicial* (g/L)	Açúcares redutores (g/L)	Açúcares redutores e totais (g/L)	Substrato consumido (g/L)	Substrato consumido (%)
1	12	50,00	0,50	1,55	48,45	96,90
2	30	50,00	0,38	1,88	48,12	96,24
3	48	50,00	0,40	1,41	48,59	97,18
4	12	50,00	0,55	1,34	48,66	97,32
5	30	50,00	0,69	1,73	48,27	96,54
6	48	50,00	0,65	1,95	48,05	96,10
7	12	50,00	0,15	1,46	48,54	97,08
8	30	50,00	0,99	1,39	48,61	97,22
9	48	50,00	0,75	1,64	48,36	96,72
10	12	150,00	0,63	1,87	148,13	98,75
11	30	150,00	0,26	2,06	147,94	98,63
12	48	150,00	0,99	1,73	148,27	98,85
13	12	150,00	0,65	2,15	147,85	98,57
14	30	150,00	0,85	1,34	148,66	99,11
15	48	150,00	0,99	2,16	147,84	98,56
16	12	150,00	1,03	2,09	147,91	98,61
17	30	150,00	1,65	1,93	148,07	98,71
18	48	150,00	0,99	2,14	147,86	98,57
19	12	250,00	0,85	1,80	248,20	99,28
20	30	250,00	0,99	1,61	248,39	99,36
21	48	250,00	0,32	2,16	247,84	99,14
22	12	250,00	0,96	1,75	248,25	99,30
23	30	250,00	0,87	1,87	248,13	99,25
24	48	250,00	0,78	1,71	248,29	99,32
25	12	250,00	0,98	2,14	247,86	99,14
26	30	250,00	0,36	1,88	248,12	99,25
27	48	250,00	0,98	1,95	248,05	99,22
28	30	150,00	0,54	2,18	147,82	98,55
29	30	150,00	0,62	2,01	147,99	98,66

*Substrato inicial = concentração de sólidos solúveis

Tabela 20. Planejamento experimental fatorial completo 3^{3-0} para a sacarose, utilizado no estudo da biomassa, PHB e alginato com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ($\rho < 0,05$)

Ensaio	Replicações	X1 Concentração de sacarose (g/L)	X2 Temperatura de incubação (°C)	X3 Tempo de incubação (h)	Biomassa (mg/mL)	PHB (mg/g de cél/h)	Alginato (mg/g de cél/h)
					* $\rho = X1; X2;$ X3; X1*X2; X1*X3; X2*X3	* $\rho = X2; X1*X2$	* $\rho = X1; X2;$ X3; X1*X2; X2*X3
1	1	2	40	18	0,83	4,17	244,26
2	1	2	40	33	0,70	3,13	173,52
3	1	2	40	48	0,57	11,74	148,01
4	1	2	50	18	1,05	9,37	184,69
5	1	2	50	33	0,67	23,41	180,86
6	1	2	50	48	0,45	1,05	172,36
7	1	2	60	18	0,35	0,00	791,04
8	1	2	60	33	0,27	52,14	458,38
9	1	2	60	48	0,27	0,00	307,02
10	1	6	40	18	1,42	0,00	213,07
11	1	6	40	33	1,39	5,44	92,71
12	1	6	40	48	1,11	17,80	70,67
13	1	6	50	18	1,36	9,89	259,57
14	1	6	50	33	0,62	49,59	228,31
15	1	6	50	48	0,75	0,00	134,36
16	1	6	60	18	0,30	16,95	1602,40
17	1	6	60	33	0,33	26,52	632,02
18	1	6	60	48	0,29	2,48	325,68
19	1	10	40	18	1,28	8,35	360,85
20	1	10	40	33	1,72	1,27	110,71
21	1	10	40	48	2,07	1,82	45,46
22	1	10	50	18	1,45	23,90	239,75
23	1	10	50	33	0,93	0,33	183,53
24	1	10	50	48	0,67	3,49	164,19
25	1	10	60	18	0,28	65,34	1213,58
26	1	10	60	33	0,30	72,70	600,81
27	1	10	60	48	0,29	0,73	955,47
28	2	2	40	18	1,16	0,00	186,85
29	2	2	40	33	0,69	31,12	174,45
30	2	2	40	48	0,50	38,22	162,61
31	2	2	50	18	0,98	4,39	230,17
32	2	2	50	33	0,59	3,31	179,14
33	2	2	50	48	0,64	11,32	108,71
34	2	2	60	18	0,22	56,06	1315,93
35	2	2	60	33	0,37	17,17	348,46
36	2	2	60	48	0,24	46,14	351,62
37	2	6	40	18	1,55	0,00	80,20
38	2	6	40	33	1,29	7,64	111,26
39	2	6	40	48	1,36	1,38	53,92

Continuação

Ensaio	Replicações	X1 Concentração de sacarose (g/L)	X2 Temperatura de incubação (°C)	X3 Tempo de incubação (h)	Biomassa (mg/mL) • $\rho = X1; X2;$ $X3; X1*X2;$ $X1*X3;$ $X2*X3$	PHB (mg/g de cél/h) • $\rho = X2; X1*X2$	Alginato (mg/g de cél/h) • $\rho = X1; X2;$ $X3; X1*X2;$ $X2*X3$
40	2	6	50	18	1,40	14,01	201,30
41	2	6	50	33	0,69	31,26	228,02
42	2	6	50	48	0,70	4,75	308,59
43	2	6	60	18	0,28	0,00	1081,43
44	2	6	60	33	0,28	0,00	662,61
45	2	6	60	48	0,26	11,09	765,03
46	2	10	40	18	1,36	4,08	385,07
47	2	10	40	33	2,17	4,23	62,20
48	2	10	40	48	1,90	10,64	53,14
49	2	10	50	18	1,59	0,00	264,74
50	2	10	50	33	0,98	32,92	136,98
51	2	10	50	48	0,67	1,80	168,35
52	2	10	60	18	0,28	70,37	2567,51
53	2	10	60	33	0,30	0,00	459,30
54	2	10	60	48	0,23	39,15	482,97
55	3	2	40	18	1,03	64,34	224,11
56	3	2	40	33	0,83	3,28	144,66
57	3	2	40	48	0,63	11,89	123,42
58	3	2	50	18	0,84	30,87	272,29
59	3	2	50	33	0,74	33,86	196,89
60	3	2	50	48	0,44	1,18	204,91
61	3	2	60	18	0,24	0,00	1083,21
62	3	2	60	33	0,28	0,00	480,78
63	3	2	60	48	0,29	0,00	313,14
64	3	6	40	18	1,26	16,17	252,13
65	3	6	40	33	1,09	12,53	138,97
66	3	6	40	48	0,87	24,41	97,24
67	3	6	50	18	1,36	1,43	251,82
68	3	6	50	33	0,58	5,91	271,82
69	3	6	50	48	0,85	0,00	103,87
70	3	6	60	18	0,24	59,45	1986,75
71	3	6	60	33	0,27	1,67	609,33
72	3	6	60	48	0,21	0,00	449,01
73	3	10	40	18	1,17	4,50	249,34
74	3	10	40	33	2,26	1,41	89,74
75	3	10	40	48	3,59	1,93	32,28
76	3	10	50	18	1,53	22,57	268,33
77	3	10	50	33	0,73	17,87	221,22
78	3	10	50	48	0,75	34,78	147,82
79	3	10	60	18	0,25	34,46	1193,86
80	3	10	60	33	0,23	12,35	686,74

Continuação

Ensaio	Replicações	X1	X2	X3	Biomassa	PHB	Alginato
		Concentração de sacarose (g/L)	Temperatura de incubação (°C)	Tempo de incubação (h)	(mg/mL) • $\rho = X1; X2; X3; X1*X2; X1*X3; X2*X3$	(mg/g de cél/h) • $\rho = X2; X1*X2$	(mg/g de cél/h) • $\rho = X1; X2; X3; X1*X2; X2*X3$
81	3	10	60	48	0,29	6,39	354,03

• $\rho =$ variável independente significativa estatisticamente ($\rho < 0,05$)

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 19/02/2009.

Assinatura