



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2013

**Ana Luísa
Ferreira Pinto**

**Produção de PHAs para valorização de um resíduo
da indústria vinícola**



**Ana Luísa
Ferreira Pinto**

**Produção de PHAs para valorização de um resíduo
da indústria vinícola**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, ramo Biotecnologia Industrial e Ambiental, realizada sob a orientação científica da Doutora Luísa A. S. Serafim, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e do Doutor Dmitry Evtyugin, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho à minha família.

o júri

Presidente

Professora Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo

professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor Paulo Alexandre da Costa Lemos

investigador auxiliar do Departamento de Química da Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Professora Doutora Luísa Alexandre Seuanes Serafim Leal

professora auxiliar convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

À Professora Luísa Serafim, pela valiosa orientação e motivação, essenciais ao meu desempenho ao longo deste trabalho.

Ao Professor Dmitry Evtyugin, pela colaboração, apoio e disponibilidade.

À Professora Ana Xavier, pelo seu envolvimento geral e acompanhamento atencioso.

À Susana Pereira, pelas lições práticas de microbiologia e psicologia de bactérias, pela ajuda com o reator, pelos incentivos constantes e verdadeiro companheirismo que tanto facilitaram o quotidiano laboratorial.

Ao Diogo Queirós, pela amizade de sempre, pelos reforços de confiança e por me motivar pelo exemplo.

À Fátima Sousa, pela ajuda nas extrações, pelo interesse genuíno com que acompanhou este trabalho e pela confiança que sempre demonstrou, que muito contribuiu para a minha desenvoltura laboratorial.

À Joana Mendes e Sónia Prozil, pela ajuda na extração do folhelho e análise dos açúcares do extrato.

Ao Doutor Paulo Lemos, pela quantificação do polímero.

À Eng.^a Ana Caço, por toda a disponibilidade de tempo e material.

Aos meus colegas do Laboratório de Engenharia Biotecnológica, 29.1.16, pela boa disposição, companheirismo, paciência e apoio indispensável.

À Diana Ferreira, pela sua importante contribuição e trabalho incansável no desenvolvimento do seu projeto de licenciatura, e pela simpatia de sempre.

À minha família e amigos, por tudo.

palavras-chave

Folhelho de Uva, Polihidroxialcanoatos, *Cupriavidus necator*, *Haloferax mediterranei*

Resumo

O objetivo deste trabalho consistiu na valorização do folhelho de uvas brancas, um subproduto da indústria vitivinícola rico em monossacarídeos, através da produção de polihidroxialcanoatos (PHAs) pelos microrganismos *Cupriavidus necator* e *Haloferax mediterranei*. Os PHAs são poliésteres intracelulares acumulados por microrganismos como reservas de carbono, com valor comercial pela sua natureza biodegradável e biocompatível.

De modo a avaliar a produção de PHAs pelos dois microrganismos, realizaram-se ensaios em meio definido suplementado com glucose e manose (meio sintético MG), os açúcares predominantes no extrato, em extrato aquoso de folhelho (EAF) suplementado com os constituintes do meio mineral.

Dos ensaios realizados em erlenmeyer com *C. necator* em EAF verificou-se que a bactéria era capaz de crescer a uma taxa específica máxima de $0,19 \text{ h}^{-1}$ até uma concentração de biomassa final de $17,11 \text{ g/L}$, com uma acumulação de $30,38\% \text{ P(3HB) (mPHA/mX)}$. No ensaio realizado em reator descontínuo com regulação de pH, em meio $50\% \text{ (v/v)}$ EAF, verificou-se o melhor resultado de produção, com a acumulação de $85,60\% \text{ P(3HB) mPHA/mX}$.

H. mediterranei revelou-se incapaz de crescer significativamente em EAF. No ensaio realizado com *H. mediterranei* em meio sintético com 2% de glucose verificou-se uma taxa específica de crescimento máxima de $0,03 \text{ h}^{-1}$, uma concentração de biomassa final de $23,66 \text{ g/L}$ e uma acumulação de $4,89 \text{ g/L P(3HB/3HV) (17,21\% mPHA/mX)}$. O polímero produzido por *H. mediterranei* foi identificado como P(3HB/3HV) , constituído por $90,04\% \text{ HB/ } 9,96\% \text{ HV}$.

Neste trabalho foi verificada pela primeira vez a adequação do EAF como meio para produção de PHAs. Estes resultados são uma contribuição valiosa no processo de valorização deste subproduto agroindustrial, e adjacente propósito de redução de custos na produção de PHAs.

keywords

Grape skins, Polyhydroxyalkanoates, *Cupriavidus necator*, *Haloferax mediterranei*

abstract

The aim of this work was the valorization of the white grape skins, a byproduct of the wine industry, through the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) using *Cupriavidus necator* and *Haloferax mediterranei*. PHAs are intracellular polyesters stored in the cell as carbon source, with commercial value as bioplastics due to its biodegradable and biocompatible nature.

Accumulation tests were carried using defined synthetic medium supplemented with glucose and mannose (main sugars in the extract) and white grape skins aqueous extract (GSAE) supplemented with mineral medium constituents.

From the tests performed in erlenmeyer with *C. necator* in GSAE it was found that bacteria could grow to a maximum specific rate of 0.19 h^{-1} to a final biomass concentration of 17.11 g.L^{-1} , with an accumulation of 30.38% P(3HB) (mPHA/mX). When production tests were performed in a batch reactor with pH regulation, using 50% (v/v) GSAE, best result of accumulation were achieved, with accumulation of 85.60% P(3HB) (mHB/mX).

H. mediterranei revealed to be unable to grow significantly in GSAE. In the test with *H. mediterranei* in synthetic medium containing 2% glucose, there was a specific maximum growth rate of 0.03 h^{-1} , a final biomass concentration of 23.66 g.L^{-1} and an accumulation of 4.89 g.L^{-1} P(3HB/3HV) (17.21% mPHA/mX). The polymer produced by *H. mediterranei* was identified as P(3HB/3HV) consisting of 90.04% HB/ 9.96% HV.

This work recognizes for the first time the suitability of the GSAE as a substrate for PHA production. These results are a valuable contribution to the valorization of this agro-industrial by-product, and adjacent cost reduction in the PHA production process.

Índice Geral

Capítulo I – Introdução.....	1
I. Introdução Geral	1
II. Revisão Bibliográfica	3
1. Biorrefinaria.....	3
2. Bioplásticos.....	4
3. Polihidroxicanoatos.....	5
3.1. Características e Propriedades dos PHAs	6
3.1.1. Poli(3-hidroxiacetato) e Poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato)	8
3.2. Metabolismo de Produção	10
3.2.1. Síntese de PHB	10
3.2.2. Síntese de P(3HB/3HV)	12
3.3. Grânulos de Reserva	12
3.4. Organismos Produtores.....	13
3.4.1. Microrganismos Geneticamente Modificados.....	13
3.4.2. Culturas Puras.....	14
3.4.3. Culturas Mistas.....	14
3.5. Produção de PHAs por <i>Cupriavidus necator</i>	15
3.6. Produção de PHAs por <i>Haloferax mediterranei</i>	17
3.7. Condições Operacionais	21
3.8. Recuperação de PHAs	22
3.9. Aplicações de PHAs	23
3.10. Biodegradação Ambiental.....	24
3.12. Sustentabilidade e Impacto Ambiental.....	27
4. Folhelho de uva.....	27
Capítulo II – Materiais e métodos	31
1. Extrato aquoso de folhelho de uva.....	31
2. Microrganismos	31
3. Meios de Cultura.....	32
3.1. Meios de cultura para <i>C. necator</i>	32
3.1.1. Meio Luria-Bertani, LB.....	32

3.1.1.1.	Meio definido para <i>C. necator</i>	32
3.1.2.	Meios de cultura para <i>H. mediterranei</i>	33
3.1.2.1.	Meio de cultura DSMZ372	33
3.1.2.2.	Meio de cultura Fang2010.....	34
4.	Ensaio de Produção de PHAs.....	35
4.1.	Ensaio com <i>C. necator</i>	35
4.1.1.	Pré-inóculos.....	35
4.1.2.	Crescimentos em “Erlenmeyer”	35
4.1.3.	Crescimentos em reator	36
4.2.	Ensaio com <i>H. mediterranei</i>	36
4.2.1.	Pré-inóculos.....	36
4.2.2.	Crescimentos em “Erlenmeyer”	36
5.	Extração do polímero.....	37
6.	Métodos experimentais e analíticos.....	37
6.1.	Quantificação da biomassa	37
6.2.	Quantificação de açúcares no extrato aquoso de folhelho.....	38
6.3.	Quantificação de açúcares por HPLC.....	38
6.4.	Quantificação de PHAs por Cromatografia Gasosa (GC).....	39
7.	Microscopia de fluorescência	39
8.	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada.....	40
9.	Tratamento de dados.....	41
Capítulo III – Resultados e Discussão.....		43
1.	Caracterização do Extrato Aquoso de Folhelho	43
2.	Ensaio com <i>C. necator</i>	44
2.1.	Ensaio preliminar em meio sintético	44
2.2.	Ensaio de produção de PHAs em meio MG e meio EAF	48
2.3.	Ensaio em reator	59
3.	Ensaio com <i>H. mediterranei</i>	64
3.1.	Crescimento em meio DSMZ372	64
3.2.	Ensaio em meio sintético com glucose	65
3.3.	Ensaio em meio EAF.....	71

Capítulo IV – Conclusões.....	73
Capítulo V – Propostas de Trabalho Futuro	75
Capítulo VI – Referências Bibliográficas.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da estrutura geral dos monómeros de polihidroxialcanoatos, onde R representa grupos alquila e n = 1-3. Alguns exemplos são dados na Tabela 1.....	7
Figura 2: Exemplo de via de síntese de P(3HB) e P(3HB/3HV) a partir de glucose e propionato(traduzido e adaptado).....	11
Figura 3: Esquema de processo para a produção de PHAs por <i>H. mediterranei</i> , a partir de resíduos complexos (traduzido).....	18
Figura 4: Embalagens de P(3HB/3HV) incubadas em lamas ativadas aeróbias durante 0, 2, 4, 6, 8 e 10 semanas (da esquerda para a direita), numa temperatura média de 20°C	26
Figura 5: Biodegradação de um filme de P(3HB) (50µm espessura) implantado subcutaneamente num rato Wistar. (A) 0,5 meses, 98% peso residual do filme; (B) 2,0 meses, 94% peso residual; (C) 2,5 meses, 28% peso residual; (D) 3,0 meses, 0% peso residual	26
Figura 6: Variação de pH, concentração de biomassa, P(3HB), glucose e manose, durante o ensaio preliminar de crescimento de <i>C. necator</i> em meio sintético MG.....	44
Figura 7: Imagem de microscopia de fluorescência com Azul de Nilo do ensaio de crescimento de <i>C. necator</i> em meio MG, às 29,65 horas, com [X] = 1,37 g/L (ampliação 100x).....	45
Figura 8: Imagem de microscopia de fluorescência com Azul de Nilo do ensaio de crescimento de <i>C. necator</i> em meio MG, às 109,5 horas, com [X] = 4,14 g/L (ampliação 100x).....	45
Figura 9: Filme de PHA obtido da extração do polímero produzido por <i>C. necator</i> em meio MG.	46
Figura 10: Espectro obtido por FTIR-ATR do filme obtido de <i>C. necator</i> mediante crescimento em meio sintético MG, com a indicação das ligações correspondentes aos picos indicados, e estrutura do monómero 3HB.	46
Figura 11: Variação de pH e da concentração de biomassa total e residual, P(3HB), glucose e manose, do ensaio de produção de PHAs por <i>C. necator</i> em meio sintético MG.....	48
Figura 12: Imagem de microscopia de fluorescência com Azul de Nilo do ensaio de crescimento de <i>C. necator</i> em meio MG, às 77,75 horas, com [X _{total}]=9,22 g/L (ampliação 1000x).	49
Figura 13: Variação de pH e da concentração de biomassa, P(3HB), glucose e manose, durante o ensaio de produção de PHAs por <i>C. necator</i> em meio EAF. Desvio padrão assinalado relativo à média da concentração de biomassa de amostras biológicas (ensaio em duplicado).	51
Figura 14: Imagem de microscopia de fluorescência com Azul de Nilo do ensaio de crescimento de <i>C. necator</i> em meio EAF, às 70,25 horas, com [X _{total}]=7,11 g/L (ampliação 400x).	52
Figura 15: Variação de pH e da concentração de biomassa, glucose e manose durante o ensaio de produção de PHAs por <i>C. necator</i> em meio EAF.	54
Figura 16: Imagem de microscopia de fluorescência com Azul de Nilo do ensaio de crescimento de <i>C. necator</i> em meio EAF, às 77,75 horas, com [X _{total}]=18,62 g/L (ampliação 1000x).	55
Figura 17: Filme de PHA obtido da extração do polímero produzido por <i>C. necator</i> em meio EAF....	55
Figura 18: Espectro de FTIR-ATR do filme de PHA produzido por <i>C. necator</i> em meio EAF, com a indicação das ligações correspondentes aos picos indicados, e estrutura do monómero 3HB.....	56
Figura 19: Fotografia do reator e respetivos controladores de pH, oxigénio, temperatura e arejamento.	59
Figura 20: Variação de pH e concentração de biomassa, P(3HB), glucose e manose durante o ensaio de produção de PHAs por <i>C. necator</i> em meio 50% (v/v) EAF, em reator.	59
Figura 21: Variação de pH e da concentração de biomassa durante o ensaio de crescimento de <i>H. mediterranei</i> em meio DSMZ372. Desvio padrão assinalado relativo à média calculada da concentração de biomassa de amostras biológicas (ensaio em duplicado).	64

Figura 22: Variação de pH e da concentração de biomassa, P(3HB/3HV) e glucose durante o ensaio de produção de PHAs por <i>H. mediterranei</i> em meio Fang2010 com 1% de glucose. Desvio padrão assinalado relativo à média calculada da concentração de biomassa de amostras biológicas (ensaio em duplicado).....	65
Figura 23: Imagens de microscopia de fluorescência com Azul de Nilo do ensaio de crescimento de <i>H. mediterranei</i> em meio Fang 1% de glucose, às 186 horas, com [biomassa]=18,86 g/L (ampliação 400x).	66
Figura 24: Variação de pH e da concentração de biomassa, P(3HB/3HV) e glucose durante o ensaio de produção de PHAs por <i>H. mediterranei</i> em meio Fang2010 com 2% de glucose. Desvio padrão assinalado relativo à média calculada da concentração de biomassa de amostras biológicas (ensaio em duplicado).....	67
Figura 25: Filme obtido na extração do polímero produzido no ensaio de <i>H. mediterranei</i> em meio Fang 2% glucose e estrutura dos monômeros 3HB e 3HV.	69
Figura 26: Espectro de FTIR-ATR do filme de PHA produzido por <i>H. mediterranei</i> em meio Fang 2%.	69
Figura 27: Variação da concentração de biomassa durante o período de incubação dos pré-inóculos de <i>H. mediterranei</i> em meio 100% EAF, e 50% EAF.	72

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos relativos à estrutura geral dos PHAs, relativamente à Figura 1.....	7
Tabela 2: Resumo das propriedades de alguns polímeros.....	9
Tabela 3: Biodegradação de um filme de P(3HB/3HV) com 1 mm de espessura, considerando diferentes ambientes.....	25
Tabela 4: Composição química do folhelho de uvas brancas (várias castas), segundo Mendes <i>et al.</i> ...	30
Tabela 5: Abundância relativa de monossacarídeos livres no extrato aquoso do folhelho de uvas brancas (várias castas).....	30
Tabela 6: Composição do meio de cultura LB.	32
Tabela 7: Composição do meio de cultura definido para <i>C. necator</i>	33
Tabela 8: Composição da solução de micronutrientes.	33
Tabela 9: Composição do meio DSMZ372.....	34
Tabela 10: Composição do meio Fang2010.	34
Tabela 11: Condições de preparação dos pré-inóculos para os crescimentos de <i>C. necator</i>	35
Tabela 12: Condições de preparação dos pré-inóculos para os crescimentos de <i>H. mediterranei</i>	36
Tabela 13: Concentração e abundância relativa de monossacarídeos no extrato aquoso do folhelho de uvas brancas da casta Touriga Nacional.....	43
Tabela 14: Parâmetros relativos ao ensaio em meio MG e ao ensaio em meio EAF.....	53
Tabela 15: Parâmetros relativos aos ensaios em meio EAF.....	58
Tabela 16: Resumo de parâmetros considerados na análise comparativa dos ensaios de <i>C. necator</i> em meio EAF, e valores da literatura.	62
Tabela 17: Resumo de parâmetros considerados na análise comparativa dos ensaios de <i>H. mediterranei</i> em meio sintético.....	70

ABREVIATURAS

$\mu_{\text{máx}}$	taxa específica de crescimento máxima
Abs	Absorvância
3HB	3-hidroxiбутирато
3HV	3-hidroxi valerato
CoA	coenzima A
CoA-SH	coenzima A livre
DSMZ	Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares (do alemão “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH”)
EAF	extrato aquoso de folhelho
EPS	Exopolissacarídeo
FID	Detetor de Ionização de Chama (do inglês “Flame Ionization Detector”)
FTIR-ATR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (do inglês “Fourier Transform Infraed spectroscopy – Attenuated Total Reflectance”)
GC-FID	Cromatografia Gasosa com Detetor de Ionização de Chama (do inglês “Gas Chromatography – Flame Ionization Detector”)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês “High-Performance Liquid Chromatography”)
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido reduzida
PHA	Polihidroxi alcanoato
P(3HB)	Polihidroxi butirato
PLA	ácido polilático
r_s	taxa de consumo de substrato
r_p	taxa de formação de produto
SP	Sumo de Pecíolos residuais da produção de óleo de palma
X	Biomassa
X_{res}	biomassa residual
$(Y_{\text{PHA/s}})_{\text{obs}}$	rendimento PHA/substrato observado
$(Y_{\text{PHA/x}})_{\text{obs}}$	rendimento PHA/biomassa observado
$(Y_{x/s})_{\text{obs}}$	rendimento biomassa/substrato observado

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO GERAL

A valorização de subprodutos agroindustriais é uma necessidade que combate os desafios de descartes de resíduos e problemas ambientais associados de um modo positivo para a respetiva indústria e economias envolventes. A utilização de subprodutos da vinificação é uma dificuldade crescente na Europa (produtora de 65% do vinho gerado mundialmente),¹ no contexto das regulamentações contra o descarte de subprodutos que afetam a erosão/compactação do solo e a qualidade das águas subterrâneas.²

A utilização do extrato aquoso de folhelho de uva (EAF), um subproduto da indústria vitivinícola, como substrato para a produção de compostos de valor acrescentado vai de encontro ao conceito de biorrefinaria lenhocelulósica. É um resíduo rico em açúcares simples,³ que tem assim potencial para ser usado como substrato para a produção de polihidroxicanoatos (PHAs).

Os PHAs são bioplásticos biodegradáveis com vantagens reconhecidas, no entanto a sua produção é dispendiosa, não conseguindo ainda competir comercialmente com os polímeros sintéticos convencionais de base petroquímica. O custo da fonte de carbono é um dos fatores que afetam a economia da produção microbiana de PHAs.⁴ A utilização de resíduos agroindustriais como o EAF pode aumentar a sustentabilidade da produção, uma vez que consiga fornecer as condições ideais para a produção de uma variedade de PHAs por diferentes bactérias, mas também permitir produtividades elevadas, de modo a desenvolver-se um processo economicamente competitivo.⁵

Assim, o objetivo do trabalho apresentado foi valorizar o folhelho de uvas brancas, utilizando os açúcares existentes no respetivo extrato aquoso como substrato para a produção microbiana de PHAs. Para isso recorreu-se à bactéria *Cupriavidus necator*, microrganismo produtor muito estudado. Adicionalmente, pretendeu-se averiguar a possibilidade de diminuir os custos energéticos relacionados com a manutenção de esterilidade do processo recorrendo a um microrganismo extremófilo, a halobactéria *Haloferax mediterranei*, um dos candidatos mais promissores para a produção industrial de PHAs.⁶ Preliminarmente, procedeu-se à caracterização do conteúdo em monossacarídeos

do extrato aquoso do folhelho e posteriormente procedeu-se ao estudo do crescimento microbiano e produção de PHAs a partir dos açúcares presentes no extrato.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. BIORREFINARIA

Os recursos fósseis como o petróleo têm estado estreitamente relacionados com o crescimento da economia mundial e têm sido explorados nas refinarias petroquímicas como fonte fundamental de energia e compostos químicos para a indústria. Nesta conjectura, a necessidade mundial de petróleo é de aproximadamente 108 milhões de barris por dia e está projetada para aumentar para cerca de 115 milhões de barris por dia até 2035.⁷ No entanto, têm surgido alguns obstáculos à exploração indiscriminada deste recurso, como a instabilidade dos preços dos recursos fósseis;⁷ a poluição resultante da exploração petroquímica, e a rápida diminuição das reservas deste recurso não-renovável.⁸ Atualmente verifica-se uma crescente pressão pública industrial para o desenvolvimento de soluções técnicas alternativas, como a utilização de matérias-primas economicamente viáveis e ecologicamente sustentáveis.

A sociedade exige materiais ecológicos de alto desempenho, a custos competitivos e reduzida dependência de recursos fósseis. Espera-se que, do uso total de energia, a parcela relativa aos combustíveis fósseis diminua de 83% em 2009 para 78% em 2035, com o uso de biocombustíveis.⁷ Neste contexto, áreas como a Química Verde e Biotecnologia Branca apostam na biomassa como a fonte de carbono para a produção de energia, combustíveis e compostos químicos, considerando três principais fatores: as alterações climáticas, segurança energética e desenvolvimento rural.⁹

De acordo com a International Energy Agency (IEA),¹⁰ biorrefinaria define-se como o processamento sustentável de biomassa para a obtenção de uma gama de produtos comercializáveis e energia. Uma biorrefinaria pode concretizar-se em processo, instalação ou mesmo conjunto de instalações, onde o “output” de um processo se torna o “input” do seguinte. As biorrefinarias têm como objetivo o processamento de recursos, como culturas e resíduos agrícolas, resíduos florestais, biomassa aquática, resíduos orgânicos e resíduos urbanos ou industriais. O objetivo é a produção de energia e uma grande variedade de produtos químicos, precursores e biomateriais, tal como as atuais refinarias petroquímicas, mas de uma forma economicamente, socialmente e ambientalmente sustentável. Para manter a competitividade estratégica, é necessário que os substratos cumpram critérios como o baixo custo, acessibilidade e facilidade de manipulação.⁹ Idealmente, a

sustentabilidade económica consegue-se mediante a capacidade de adquirir diferentes tipos de biomassa e produzir vários produtos, todos com valor, seguindo, para a determinação da escala e estratégia de produção, um esquema “high value – low volume”, no qual o elevado valor agregado e baixo volume de produção define a estrutura de produção de especialidades; e “low value – high volume”, onde há um baixo valor agregado e maior estrutura de produção, e a sustentabilidade é alcançada em grande escala.¹¹

Pretende-se que o mercado baseado no conceito de biorrefinaria resulte em indústrias com pouco impacto ambiental. Em última instância, as biorrefinarias devem ser caracterizadas por uma integração eficiente de várias etapas de manipulação e processamento de biomassa, fermentação em biorreactores, processamento químico, recuperação final e purificação do produto.¹⁰

Os bioplásticos de origem microbiana, como os PHAs, são um exemplo de produto que pode ser obtido em biorrefinaria, por exemplo, como um bom complemento à produção de bioetanol,¹²⁻¹⁴ tendo como substrato biomassa lenhocelulósica, na medida em que aumenta a flexibilidade do processo.

2. BIOPLÁSTICOS

O termo “plásticos” refere-se a uma ampla gama de materiais poliméricos sintéticos ou semissintéticos que, em algum momento da sua fabricação, permitem ser manipulados de tal forma que podem ser extrusados, fundidos, moldados, fiados ou aplicados como um revestimento.¹⁵ Os plásticos são ubíquos e essenciais à vida quotidiana, na medida em que muitos produtos modernos contêm pelo menos alguns componentes destes materiais, essencialmente devido à sua polivalência e durabilidade. Como categoria, os plásticos são materiais consideravelmente versáteis e perduráveis, podendo ser baratos, leves, fortes, resistentes à corrosão, com boas propriedades de isolamento térmico e elétrico.¹⁵

A indústria do plástico tem um impacto significativo na economia mundial. De acordo com a Plastics Europe, de 2009 a 2010 a produção mundial de plásticos aumentou cerca de 15 milhões de toneladas (6%), atingindo 265 milhões de toneladas, confirmando a tendência de longo prazo da procura de plásticos e crescimento da produção de quase 5% por ano durante os últimos 20 anos.¹⁶ Tradicionalmente, a utilização mais substancial de plásticos, responsável por mais de um terço da produção, é em embalagens descartáveis, a maioria dos quais descartadas aproximadamente um ano após fabricação, representando

sensivelmente 10% dos resíduos gerados.¹⁵ Considerando que a maioria dos plásticos deriva do petróleo e não é biodegradável, o aumento inevitável do seu uso cria um problema considerável de gestão de resíduos, devido à sua durabilidade e resistência, reduzida taxa de decomposição, toxicidade após incineração, e acumulação em aterros e ambientes marinhos.^{5, 17} Qualquer abordagem que vise a melhoria da gestão de resíduos e proteção do ambiente deve combinar reciclagem e estratégias de recuperação de energia, mas também de investigação e investimento no desenvolvimento de materiais substitutos.

A definição mais abrangente de bioplásticos descreve um material polimérico que seja proveniente, pelo menos parcialmente, de matérias-primas renováveis e/ou que seja de alguma forma biodegradável.¹⁸ Complementarmente, o carácter ambiental é destacado se apresentarem um processamento ecologicamente sustentável. De acordo com as definições anteriores, os bioplásticos podem ser classificados em três grupos: biodegradáveis baseados no petróleo, não-biodegradáveis de base biológica renovável e biodegradáveis de base biológica renovável.^{17, 18} Considerando o interesse em ultrapassar as desvantagens associadas aos plásticos convencionais, mediante o distanciamento das matérias-primas fósseis e favorecimento da biodegradação, o principal grupo de bioplásticos a suscitar maior interesse como substituto dos plásticos convencionais é o grupo de biodegradáveis de base biológica renovável. Destes destacam-se, com maior potencial no mercado, os biopoliésteres microbianos polilactato (PLA), obtido a partir de ácido láctico, e os PHAs.^{19, 20} Até agora, os bioplásticos ainda representam menos de 1% do volume global de plásticos produzidos anualmente, do total aproximado de 265 milhões de toneladas. No entanto, a produção de bioplásticos de aproximadamente 1,16 milhões de toneladas produzidas em 2011 está projetada para aumentar 500% para uma capacidade aproximada de 6 milhões de toneladas em 2016.²¹

3. POLIHIDROXIALCANOATOS

Os PHAs são bioplásticos com potencial para produção num processo integrado para o aproveitamento de vários resíduos. Os PHAs destacam-se dos demais bioplásticos e despertam o interesse da investigação e indústria devido às suas características como biocompatibilidade, versatilidade, biossíntese a partir de recursos renováveis, propriedades termoplásticas próximas às dos plásticos sintéticos e, após descarte, biodegradação total.¹⁹

Apesar das suas inúmeras vantagens, estes bioplásticos ainda não conseguem competir a larga escala com os plásticos convencionais devido ao elevado custo de produção.

Em 1995, Hänggi definiu critérios exigidos aos poliésteres bacterianos para que estes possam ter sustentabilidade na produção em larga escala: (i) satisfazer um mercado com necessidades urgentes; (ii) possuir sistemas eficientes de compostagem instalados em áreas urbanas; (iii) possuir qualidade e desempenho de processamento competitivo com os plásticos petroquímicos atuais; (iv) satisfazer os requerimentos necessários para se qualificarem próprios para embalar alimentos; (v) possuir um preço competitivo.²² Os PHAs são produzidos comercialmente, embora com um sucesso limitado, considerando o seu potencial, devido ao custo elevado da sua produção.²³ A sua sustentabilidade depende do aproveitamento de resíduos num contexto integrado e do rendimento das estirpes produtoras. Uma produção eficiente de PHAs deve utilizar estirpes com elevado rendimento na acumulação do polímero, a partir de fontes de carbono (e outros nutrientes) baratas, facilmente disponíveis e que não compitam com fontes alimentares; resultando numa alta produtividade de processo e consumo mínimo de energia, que se deverá complementar com um processo de extração simples e de baixo custo.⁴

3.1. CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES DOS PHAS

Os PHAs são um amplo grupo de biopoliésteres alifáticos lineares de ácidos hidroxialcanóicos,²⁴ acumulados por microrganismos em grânulos intracelulares como fontes de reserva de carbono, maioritariamente produzidos em condições limitantes de nutrientes essenciais ao crescimento (ex. azoto, fósforo, magnésio ou oxigénio) e excesso de fonte de carbono;^{6, 25} podendo também ser sintetizados por células eucariotas modificadas geneticamente, nomeadamente em plantas,²⁶ leveduras²⁷ ou insetos.²⁸

Os PHAs variam no número de monómeros e/ou substituição de grupos alquila. Os monómeros de PHAs são, normalmente, 3-hidroxialcanoatos (3HA) de 3 até mais de 14 átomos de carbono e/ou, com menor frequência, 4-hidroxialcanoatos (4HA) e 5-hidroxialcanoatos (5HA) de 3 a 5 átomos de carbono.^{29, 30} A estrutura química geral dos monómeros está representada na Figura 1, apoiada pela Tabela 1.^{31, 32} A polimerização acontece mediante uma ligação éster entre o grupo carboxilo de um monómero e o grupo hidroxilo do monómero vizinho.³³

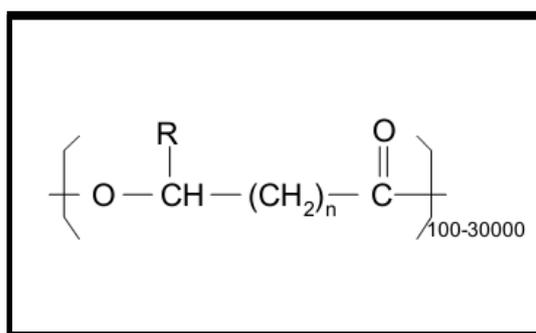


Figura 1: Esquema da estrutura geral dos monómeros de polihidroxialcanoatos, onde **R** representa grupos alquila e **n** = 1-3. Alguns exemplos são dados na Tabela 1.

n	R	Polímero
1	-H	Poli(3-hidroxiopropionato) : P(3HP)
1	-CH ₃	Poli(3-hidroxi butirato) : P(3HB)
1	-CH ₂ CH ₃	Poli(3-hidroxi valerato) : P(3HV)
1	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	Poli(3-hidroxi hexanoato) : P(3HHx)
2	-H	Poli(4-hidroxi butirato) : P(4HB)
3	-H	Poli(5-hidroxi valerato) : P(5HV)

Tabela 1: Exemplos relativos à estrutura geral dos PHAs, relativamente à Figura 1.

O tipo de radical R dá origem às diferentes unidades monoméricas, variando de um único átomo de hidrogénio até cadeias com mais de 14 átomos de carbono, podendo, por exemplo, ser saturado ou insaturado, linear, ramificado ou cíclico, conter ligações duplas, ou ainda átomos de flúor, cloro ou azoto.²⁵ Destas variações advém a elevada diversidade de propriedades dos PHAs. A sua composição monomérica determina as características dos PHAs, como as propriedades termoplásticas, elastoméricas, enantioméricas, piezoelétricas, insolubilidade em água, toxicidade, grau de polimerização, pesos moleculares e gama de cristalinidade.³⁴ Depois de sintetizados, existe ainda a possibilidade de modificar/funcionalizar os polímeros, através de métodos químicos ou enzimáticos.³⁵ A massa molecular destes biopolímeros depende da estirpe produtora e condições de crescimento, e varia geralmente entre $2,0 \times 10^5$ e $3,0 \times 10^6$.³¹ Relativamente ao seu tamanho, tendo em conta o número de átomos de carbono do monómero, os PHAs podem ser divididos em três classes:^{30,31}

- PHAs de cadeia curta (PHA_{scl}, do inglês “short chain length”), com monómeros de 3 a 5 carbonos. Tendem a ser bastante frágeis e quebradiços.
- PHAs de cadeia média (PHA_{mcl}, do inglês “medium chain length”), com monómeros de 6 a 14 carbonos. Estes têm baixo ponto de fusão, baixa temperatura de transição vítrea, baixa cristalinidade mas maior alongamento à rutura, relativamente aos PHA_{scl}, tornando-se mais macios à medida que aumenta o comprimento da cadeia.
- PHAs de cadeia longa (PHA_{lcl}, do inglês “long chain length”), com monómeros de mais de 14 carbonos, menos comuns.³⁰

É possível obter uma variedade de composições, manipulando as condições de fermentação, estirpe bacteriana, fonte de carbono e possível presença de precursores.^{36, 37} Por exemplo, o poli-3-hidroxi-butirato, P(3HB), pode ser obtido a partir de acetato e butirato, enquanto que uma mistura de acetato e propionato ou valerato e propionato levam à síntese de um polímero composto por 3-hidroxi-butirato (3HB), 3-hidroxi-valerato (3HV) e 2-metil-3-hidroxi-valerato.^{37, 38}

Os PHAs podem ser homopolímeros (por exemplo, P(3HB); poli-3-hidroxi-valerato – P(3HV); poli-3-hidroxi-hexanoato – P(3HHx) ou copolímeros (por exemplo, poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato – P(3HB/3HV)). Os copolímeros têm potencial para reunir características mais versáteis. Nestes dois tipos, evidenciam-se o P(3HB) e o P(3HB/3HV), por serem extensivamente estudados e referenciados com boas perspectivas comerciais.

3.1.1. Poli(3-hidroxi-butirato) e Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato)

Em 1926, Lemoigne verificou pela primeira vez a formação de PHAs em corpos de inclusão de *Bacillus megaterium*,³⁹ e apurou que se tratava de P(3HB). O P(3HB) é um homopolímero de cadeia curta, considerado um termoplástico frágil, com apenas 5 a 10% de alongamento à ruptura, o que limita consideravelmente a sua aplicação.^{36, 40, 41} A cristalinidade deste polímero ronda os 60 a 70%,^{40, 41} e as suas propriedades mecânicas como a resistência à tração são próximas às do polipropileno, mas o alongamento à ruptura é significativamente menor.⁴² O P(3HB) é pouco resistente à degradação durante o processamento térmico do polímero, revelando instabilidade a temperaturas superiores a 160 °C.⁴³ A incorporação de outros monómeros, tais como o 3HV, interrompe a constituição cristalina do P(3HB) e cria poliésteres com melhores propriedades físicas e termodinâmicas.⁴⁴ Por exemplo, para um copolímero com 20% mol 3HV verificou-se um menor grau de cristalinidade, 56%,^{29, 41} o que torna o material mais flexível, resultando em melhores propriedades de força. Para além disso, tanto a temperatura de transição vítrea como a temperatura de fusão também diminuem com o aumento de unidades 3HV até 40% da composição, o que permite aumentar a janela de processamento.³⁶ Isto significa que existe uma maior distância entre a temperatura de fusão e a temperatura de decomposição, permitindo ampliar a capacidade de processamento para a fabricação dos itens desejados.³⁴ O copolímero P(3HB/3HV) resultante tem valores mais elevados quer de alongamento à

rutura, 50% (considerando, de igual modo, 20% mol 3HV)^{29, 41} quer de resistência ao impacto, indicando que tem também menor rigidez.⁴² É apresentado, na Tabela 2, um resumo das propriedades de P(3HB), P(3HB/3HV) e polipropileno, de modo permitir a comparação de propriedades entre os PHAs mais comuns e um polímero sintético, e averiguar ainda como o aumento da percentagem de monómeros de 3HV no copolímero influencia a variação das suas propriedades.

Tabela 2: Resumo das propriedades de alguns polímeros.^{40, 42, 45}

Propriedade	P(3HB)	P(3HB/3HV)			Polipropileno
		3 % mol3HV	14 % mol3HV	20 % mol3HV	
Ponto de Fusão (°C)	179	170	150	145	170
Temperatura de Transição Vítrea (°C)	5 - 10	n. d.	n. d.	n. d.	-10
Cristalinidade (%)	60 - 70	n. d.	n. d.	56	50-70
Tensão de cisalhamento (MPa)	40	38	35	20 - 32	34.5
Alongamento à Rutura (%)	5 - 10	n. d.	n. d.	50	400

n. d. – não definido. (**Temperatura de transição vítrea** é o valor de temperatura ao qual um termoplástico sofre uma mudança, variando entre um estado dúctil e um estado frágil. **Cristalinidade** é a fração volumétrica correspondente à região cristalina, cujo empacotamento molecular se dispõe num arranjo de elevado grau de compactação. **Tensão de cisalhamento**, ou tangencial, é o valor do quociente entre a força tangencial ao plano de rutura constante, e a área sob a qual age a força – representa a tensão tangencial ao plano de rutura que o polímero suporta sem sofrer rutura. **Alongamento à rutura** representa o aumento percentual do comprimento da peça sob tração no momento da rutura, e é tão maior quanto menor é a fragilidade do polímero.)

No geral, reconhece-se que o P(3HB/3HV) tem bastante potencial em mimetizar as propriedades dos plásticos convencionais. Para a biossíntese de P(3HB/3HV) pode ser necessário, no entanto, que se forneça um substrato precursor, geralmente o ácido propiónico ou ácido valérico. Análises do Ciclo de Vida efetuadas aos processos convencionais de produção de P(3HB/3HV) mostraram que os custos de produção tendem a aumentar linearmente com o aumento da fração de 3HV.⁴⁶

3.2. METABOLISMO DE PRODUÇÃO

Os microrganismos transformam açúcares e ácidos gordos em PHAs através de vias metabólicas diferentes, que envolvem como intermediário acetil-CoA, que em condições nutricionais não equilibradas é desviado do ciclo de Krebs, e terminam com a polimerização de monómeros pela PHA polimerase. A capacidade dos microrganismos para sintetizar uma forma particular de PHAs deve-se principalmente à especificidade enzimática pelo substrato.²⁵

3.2.1. Síntese de PHB

O P(3HB) é o PHA mais comum na natureza e o que é sintetizado por vias metabólicas mais simples. As três enzimas necessárias à síntese de P(3HB) estão situadas no citoplasma da célula, onde se dá a formação dos grânulos de reserva.³³ Considerando como microrganismo representativo a bactéria *Cupriavidus necator*, três enzimas são expressas a partir de um operão e são responsáveis pela produção de P(3HB) a partir de acetil-CoA. Neste microrganismo, os genes *phbC*, *phbA* e *phbB* codificam respectivamente as enzimas P(3HB) polimerase, acetoacetil-CoA redutase e β -cetotiolase, constituindo o operão *phbCAB*, transcrito completamente por um promotor “upstream” do *phbC*. A β -cetotiolase condensa duas moléculas de acetil-CoA para produzir acetoacetil-CoA, numa reação dependente de ATP. Acetoacetil-CoA é então reduzido a (R)-3-hidroxi-butiril-CoA pela acetoacetil-CoA redutase (R)-específica, aquando da oxidação de uma molécula de NADPH. Os monómeros (R)-3-hidroxi-butiril-CoA são então polimerizados pela PHA polimerase⁴⁷ (Figura 3).

A β -cetotiolase compete pelo acetil-CoA com a citrato sintase, enzima interveniente no ciclo de Krebs que neste liberta CoASH. Em condições equilibradas do metabolismo celular existe elevada quantidade de CoASH que inibe a β -cetotiolase. Numa situação de limitação (oxigénio, por exemplo) com excesso de carbono, há um excesso de NADH que inibe a citrato sintase. Consequentemente há uma diminuição da quantidade de CoASH e acumulação de acetil-CoA, o que suplanta a inibição da β -cetotiolase e permite que esta inicie a via de síntese de P(3HB).³⁷

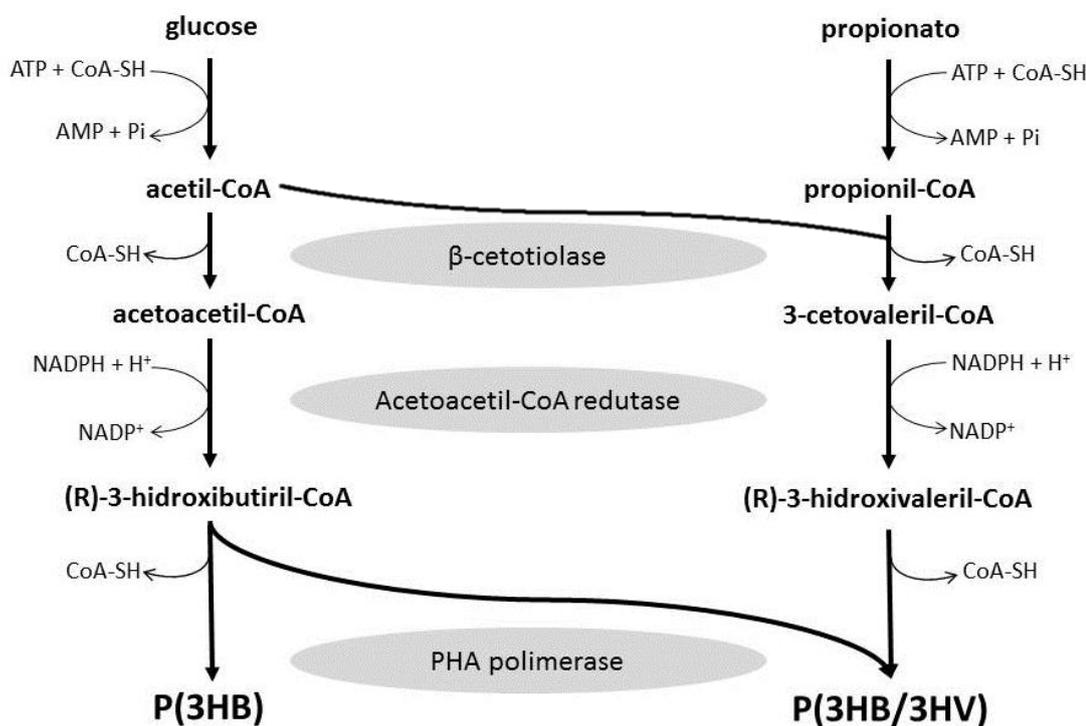


Figura 2: Exemplo de via de síntese de P(3HB) e P(3HB/3HV) por *C. necator* a partir de glucose e propionato (traduzido e adaptado).²⁶

Para além desta via referida como exemplo, existem outras relevantes, nomeadamente de *Rhodopseudomonas* e *Pseudomonas* do Grupo I e II de homologia de rRNA.⁴² Além disso, o operão referido não tem sempre a disposição correspondente ao de *C. necator*, podendo os genes não estar na mesma ordem,²⁶ ou mesmo nem estar no mesmo operão.⁴⁸

3.2.2. Síntese de P(3HB/3HV)

Para a acumulação de P(3HB/3HV), para além da presença de hidratos de carbono como frutose ou glucose para a formação de acetil-coA e consequente síntese do monómero 3HB, pode ser necessária a presença de co-substratos percursores, como propionato ou valerato, para a síntese de 3HV. Sabe-se que o propionato, entre outros percursores, pode ser prejudicial para o crescimento celular e, portanto, o processo precisa de um controlo rigoroso para manter uma baixa concentração de propionato, normalmente numa estratégia em semi-contínuo.³⁶ As reações para a síntese de P(3HB/3HV) são catalisadas pelas mesmas enzimas, β -cetotiolase, acetoacetil-CoA redutase e PHA polimerase. No geral, a síntese de P(3HB/3HV) passa pela formação de 3HB e 3HV, que são depois polimerizados. A via biossintética para a produção de P(3HB/3HV) começa, sob a ação da β -cetotiolase, com a condensação de acetil-CoA com propionil-CoA, resultando em 3-cetovaleril-CoA, e, paralelamente, a condensação de duas moléculas de acetil-CoA, resultando em acetoacetil-CoA. Estes compostos são reduzidos a (R)-3-hidroxicetovaleril-CoA e (R)-3-hidroxiacetil-CoA, respetivamente, sob a ação da enzima acetoacetil-CoA redutase (R)-específica, com a oxidação de uma molécula de NADPH. Os monómeros são então polimerizados pela PHA polimerase (Figura 3).⁴⁹

3.3. GRÂNULOS DE RESERVA

A acumulação de PHAs em microrganismos ocorre no citoplasma, sob a forma de corpos de inclusão amorfos móveis e insolúveis em água,²⁴ de modo a não alterar o estado osmótico das células e manter os compostos disponíveis. A constituição geral dos grânulos de reserva é aproximadamente 97,7% PHAs, 1,8% proteínas e 0,5% lípidos.²⁴ Na síntese dos grânulos de PHAs, a PHA polimerase converte-se numa molécula anfifílica, mantendo-se ligada covalentemente ao biopolímero durante a elongação da cadeia, permanecendo à superfície do grânulo.⁵⁰ Proteínas e lípidos formam um revestimento membranar que envolve a região central e estabiliza a transição entre a região central hidrofóbica e as suas imediações hidrofílicas.^{24, 51} O revestimento membranar tem a seguinte estrutura geral: monocamada fosfolipídica,⁵² que evita o contacto dos PHAs com a água;⁵³ PHA polimerases ligadas covalentemente; PHA despolimerases intracelulares mantidas por interações hidrofóbicas; proteínas citosólicas não ligadas covalentemente,

nomeadamente proteínas estruturais como fasinas, estabilizadoras e reguladoras dos grânulos;⁵⁴ e ainda outras proteínas de função desconhecida. Os grânulos chegam a representar 90% em peso seco da célula, podendo atingir um diâmetro a variar entre os 0,1 a 0,8 μm .³⁶

3.4. ORGANISMOS PRODUTORES

A viabilidade da produção depende principalmente da densidade celular final, taxa de crescimento microbiano, percentagem de PHAs no peso seco, do substrato e respetivo preço, e dos métodos de extração e purificação.²⁰ Por estas razões, os critérios a ter em conta na escolha do microrganismo são a capacidade de utilizar fontes de carbono baratas, possuir taxas de crescimento e de polimerização elevadas, e capacidade substancial de acumulação do polímero.⁵⁵ Nos sistemas naturais, podem ser definidos dois grupos relativos às condições necessárias à acumulação de PHAs.⁵⁶ Um primeiro requer limitação de um nutriente essencial como azoto, fósforo, magnésio ou enxofre, com a fonte de carbono em excesso; no qual se incluem *C. necator*, *Protomonas extorquens* e *Pseudomonas oleovorans*, entre outros.⁴² Um segundo grupo não necessita de limitação de nutrientes e pode acumular o biopolímero durante o crescimento, por exemplo *Alcaligenes latus*,⁴² e *Haloferax mediterranei*.⁵⁷

3.4.1. Microrganismos Geneticamente Modificados

Para assegurar a competitividade da produção bacteriana de PHAs é desejável um microrganismo com alta eficiência de produção, preferencialmente capaz de acumular mais de 60% (m/m) do seu peso seco da biomassa em polímero, utilizando substratos económicos, como os resíduos orgânicos industriais, e ainda que permita a extração fácil e económica do biopolímero produzido.⁵⁸ É nestes pontos que se foca a intervenção da engenharia genética. A otimização do rendimento de produção pode ser feita de várias maneiras, por exemplo: sobre expressar enzimas relevantes na via de síntese de PHAs,⁵⁹ recorrer a mutagénese direcionada a fim de melhorar a eficiência enzimática na conversão de substrato,⁶⁰ ou ainda modificar/implementar novas vias metabólicas para a utilização eficiente de substratos renováveis baratos.^{61, 62} A *E. coli* recombinante é o microrganismo mais utilizado nesta abordagem para produção de PHA, devido à conveniência associada à

sua manipulação genética, capacidade de atingir elevada densidade celular a partir de fontes de carbono baratas, e permitir fácil extração do polímero.^{20, 63} A *E. coli* recombinante permitiu, por exemplo, a acumulação de cerca de 80% P(3HB) em peso seco da biomassa, utilizando soro de leite como substrato, numa produção em semi-contínuo de elevada densidade celular.⁶⁴

A instabilidade genética é um dos principais obstáculos para a produção de PHAs por organismos recombinantes. A elevada carga genética pode levar à instabilidade e perda do plasmídeo ao longo das gerações e, conseqüentemente, comprometer os elevados rendimentos da produção.⁶⁵

3.4.2. Culturas Puras

Atualmente, grande parte da produção industrial de PHAs tem como base estirpes de culturas puras como *C. necator*, *Alcaligenes latus*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus spp.*, *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas oleovorans*.^{19, 66} O uso generalizado de culturas puras deve-se ao facto de estas terem uma elevada capacidade de produção de PHAs, embora culturas puras nativas estejam associadas à necessidade de substratos caros, maior controlo de produção e equipamento de esterilização, exigindo à partida um maior investimento, o que resulta numa menor competitividade de custo perante o mercado global dos plásticos.^{19, 67}

3.4.3. Culturas Mistas

Na produção industrial é necessário ultrapassar os custos operacionais adjacentes à necessidade de esterilização, ações que requerem elevada manutenção de reator. Nesse sentido, surge o interesse nas culturas microbianas mistas, populações de composição desconhecida, selecionadas pelas condições impostas sobre a comunidade microbológica. Estas podem ser mantidas sem custos associados à esterilização, já que o favorecimento da elevada capacidade de acumulação ocorre pela imposição de determinadas condições operacionais. Além disso, conseguem usar uma variedade de fontes nutricionais baratas, incluindo resíduos industriais, diminuindo ainda mais os custos de “input” e permitindo aumentar a escala de produção.^{32, 66, 68} A utilização de culturas microbianas mistas para produção de PHAs apresenta resultados promissores, nomeadamente em termos de rendimento e produtividade específica, relativamente a vários substratos,^{69, 70}

maioritariamente sob a estratégia de alimentação dinâmica aeróbia.⁷¹ No entanto, ainda é necessário ultrapassar algumas desvantagens associadas, como os baixos valores de densidade celular, entre outros.^{38, 72}

3.5. PRODUÇÃO DE PHAS POR *CUPRIAVIDUS NECATOR*

C. necator é uma bactéria gram-negativa, anteriormente classificada como *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*, *Hydrogenomonas eutrophus*, ou ainda *Waustersia eutropha*.⁷³ É uma bactéria aeróbia e mesofílica, com temperatura ótima de crescimento de 27 °C.⁷⁴ Os valores ótimos de pH para o crescimento de *C. necator* situam-se entre 7,0 e 8,0, sendo inibida em valores de pH inferiores a 5,5 e superiores a 9,2.⁷⁵ *C. necator* é predador não obrigatório, causando a lise no solo de várias bactérias gram-positivas e gram-negativas, inclusive de outros predadores bacterianos não obrigatórios. Tem uma elevada resistência ao cobre, e o início do seu crescimento é estimulado pelo cobre. Estas características estão vincadas na sua nomenclatura, uma vez que o termo *Cupriavidus* deriva do latim “cuprum” (cobre) e “avidus” (ávido, insaciável), e *necator* pode ser traduzido do latim como assassino.⁷⁴

C. necator é o microrganismo produtor de PHAs mais estudado e o mais utilizado comercialmente, devido à sua capacidade de acumular P(3HB) até mais de 80% do seu peso seco.²⁰ *C. necator* produz naturalmente o homopolímero P(3HB), conseguindo produzir copolímeros compostos por vários outros monómeros após a adição de precursores ao meio de cultura.^{76, 77} A acumulação ocorre geralmente em condições não balanceadas de crescimento, na presença de excesso da fonte de carbono e com limitação de nutrientes como azoto, fósforo, magnésio, oxigénio ou enxofre. *C. necator* produz PHAs a partir de uma ampla gama de substratos como hidratos de carbono (*e. g.* frutose, xilose, glucose, sacarose, lactose), glicerol, ácidos (*e. g.* ácido fumárico, ácido láctico, ácido propiónico), entre outros.^{42, 78, 79} Khanna *et al.* (2005) estudaram a produção de PHAs por *C. necator* em vários substratos. Os melhores resultados verificaram-se no ensaio realizado em meio com frutose (20 g/L) e sulfato de amónia como fontes de carbono e azoto, respetivamente, tendo verificado uma concentração celular máxima de 3,25 g/L e uma concentração de P(3HB) de 1,4 g/L, em 48 horas de incubação. O ensaio realizado nas mesmas condições, mas com glucose (20 g/L) como fonte de carbono, resultou numa

concentração celular de 2,3 g/L e concentração de P(3HB) de 0,031 g/L.⁴² Apesar da glucose não permitir um rendimento tão elevado como a frutose, apresentou-se como um bom compromisso entre o rendimento de produção de P(3HB) e o custo da produção associado à fonte de carbono, ao ser geralmente um monossacarídeo mais barato e mais recorrente em subprodutos de baixo custo.

Foi verificada a aptidão de *C. necator* para produzir PHA a partir de vários substratos de matriz complexa como subprodutos agroindustriais. Estudos realizados por Fukui *et al.* (1998) investigaram a produção de PHAs por *C. necator* H16, incubada em meio mineral com 1% (v/v) de óleos vegetais (azeite, óleo de milho e óleo de palma) como fonte de carbono e sob limitação de azoto, tendo verificado acumulação de P(3HB) até 81% (m/m) de peso seco de biomassa, para uma concentração celular média de 4 g/L, em 72 horas de incubação.⁸⁰ Estudos comparativos realizados por Obruca *et al.* (2010) constataram que a acumulação de PHAs por *C. necator* H16 é superior em óleos vegetais usados em frituras de alimentos que em óleos vegetais não usados. Por exemplo, recorrendo a óleo de colza usado em frituras numa cantina universitária foi verificada uma concentração de 7,7 g/L P(3HB), superior à concentração de 4,8 g/L P(3HB) obtida relativamente ao mesmo óleo não processado (testes realizados em 72 horas de incubação). Os autores explicam que a aptidão superior dos óleos processados para serem usados na produção de PHAs por *C. necator* se deve às modificações do óleo no processo de fritura, como alteração da composição dos ácidos gordos, aumento da concentração de ácidos gordos livres e transferência de componentes do alimento frito (proteínas, lípidos ou hidratos de carbono) para o óleo.⁸¹

Uma estirpe adaptada de *C. necator* revelou capacidade de produção de PHAs (57% peso seco de biomassa, concentração celular de 11 g/L) com remoção de compostos inibitórios de hidrolisado lenhocelulósico de bagaço de cana-de-açúcar diluído, mediante uma elevada concentração de biomassa inicial. A estirpe removeu ácido fórmico, ácido acético, furfural, lenhina solúvel em ácido e compostos fenólicos, e uma vez que a xilose, arabinose e oligossacarídeos não foram utilizados, o hidrolisado recuperado pode ser usado para outras produções.⁸² A tolerância demonstrada relativamente a compostos tendencialmente inibidores é uma vantagem que poderá alargar a gama de substratos complexos de baixo custo acessíveis à produção de PHAs por *C. necator*.

3.6. PRODUÇÃO DE PHAS POR *HALOFERAX MEDITERRANEI*

Os microrganismos extremófilos não apenas toleram como têm um desenvolvimento ótimo em ambientes considerados inóspitos, como condições extremas de pH, temperatura ou salinidade, revelando elevado potencial para aplicações biotecnológicas. Os microrganismos halófilos necessitam de elevadas concentrações de sal para se desenvolverem,²⁵ esperando-se geralmente um crescimento ótimo a uma concentração próxima ou superior a 5% NaCl (m/v).⁸³

Haloferax mediterranei é um microrganismo halófilo extremo. Cresce com 2 a 5 M de cloreto de sódio (NaCl),³⁴ estando reportada como a halobactéria com maior capacidade de produção de PHAs na família *Halobacteriaceae*, e um dos maiores produtores ao nível dos procariontes em geral.^{25, 57, 84} Idealmente, a produção de PHAs por *H. mediterranei* tende a seguir o esquema proposto por Koller *et al.* (2011), apresentado da Figura 3.^{47, 67}

As condições salinas extremas necessárias ao correto desenvolvimento destes microrganismos permitem a eliminação da necessidade de esterilização e custos consequentes.^{25, 36, 85} Os sais do meio podem ser reciclados, de modo a reduzir o custo geral do processo e minimizar os riscos ecológicos implícitos ao descarte dos resíduos pós-fermentação.²⁵ Para além disso, após acumulação, a lise dá-se facilmente após a transferência das células para um meio hipotónico.^{24, 36, 84}

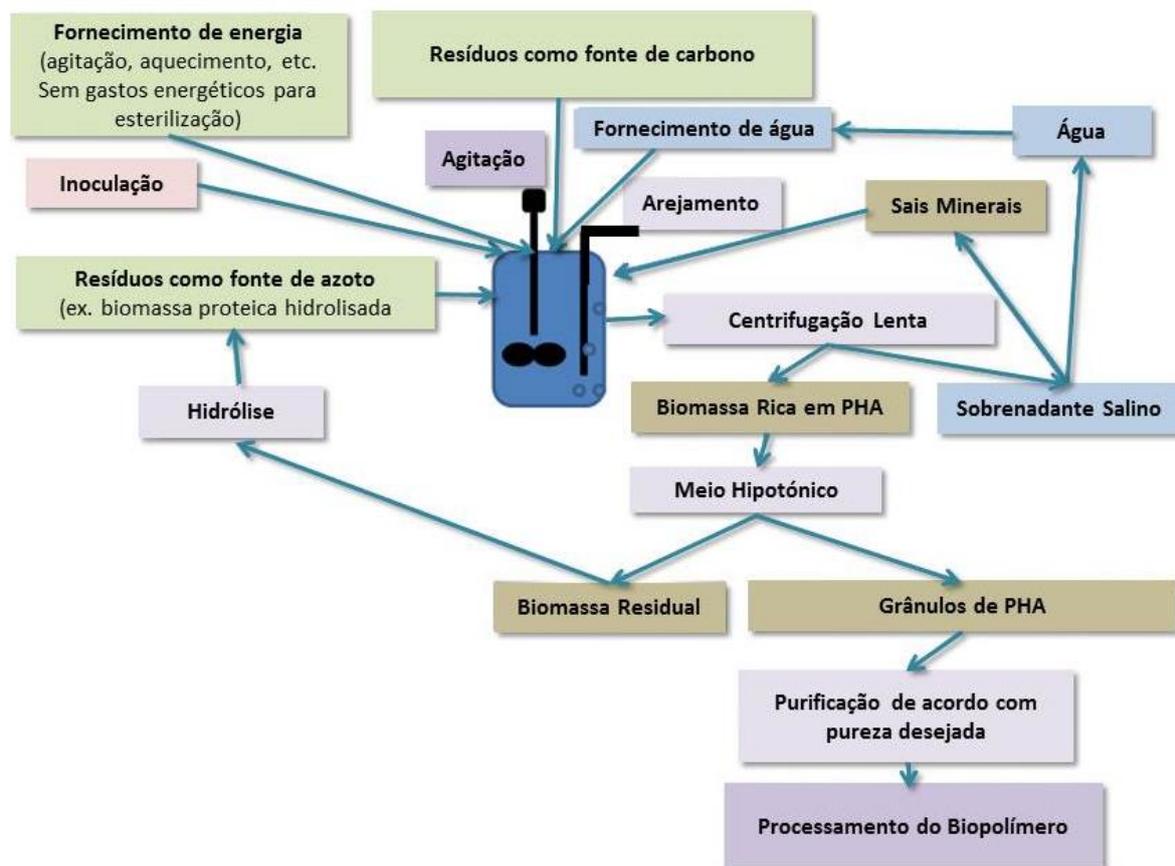


Figura 3: Esquema de processo para a produção de PHAs por *H. mediterranei*, a partir de resíduos complexos (traduzido).^{56, 64}

A estrutura química do PHA produzido por *H. mediterranei* corresponde ao copolímero P(3HB/3HV),^{6, 36} biopolímero com boas características de processabilidade. Ao contrário da produção bacteriana de P(3HB/3HV) onde são necessários precursores de monómeros de 3HV, como o ácido propiónico ou ácido valérico, *H. mediterranei* consegue acumular até mais de 60% P(3HB/3HV) (m/m) sem adição de precursores, adquirindo vantagem competitiva acrescida ao conseguir atingir elevadas concentrações de biomassa numa gama variada de meios,^{6, 34} nomeadamente subprodutos industriais.⁶ Em *H. mediterranei* a elevada capacidade de acumulação do polímero está aliada à estabilidade genética,⁶ vantagem que surge comparativamente a *E. coli* e outros microrganismos recombinantes com alta capacidade de produção, mas geneticamente instáveis. Além disso permite obter elevada densidade celular a partir de substratos baratos.⁸⁶ O preço de produção de 1 kg de P(3HB/3HV), em 2007, foi calculado em 2,82€, considerando uma produtividade volumétrica de 0,29 g/(L.h) e soro de leite hidrolisado como fonte de carbono para *H. mediterranei*.⁸⁷ Este preço é significativamente menor do que o então

calculado para a produção de PHAs por *E. coli* recombinante, 4,00€, utilizando o mesmo substrato.^{25, 87}

Por se verificar, no geral, um grande potencial para a produção de PHAs, *H. mediterranei* suscitou um grande interesse na comunidade científica. Fernandez-Castillo *et al.* (1986) obtiveram uma acumulação de 38% PHB (m/m) de peso seco, em meio contendo 1% (m/v) glucose e 0,1% (m/v) extrato de levedura, com 15% (m/v) de concentração salina; tendo o rendimento diminuído para metade com aumento da concentração de sais para 30%.⁸⁴ Lillo e Rodriguez-Valera (1990) propuseram, pela primeira vez, *H. mediterranei* como candidata adequada para produção industrial de PHAs, tendo estudado sistemas de produção em descontínuo e em contínuo. Em descontínuo foi conseguido um conteúdo em PHAs de 60% do peso seco da biomassa, para condições consideradas ótimas de 2% (m/v) amido, 0,00375% (m/v) dihidrogenoortofosfato de potássio (KH₂PO₄) e 0,2% (m/v) cloreto de amónia (NH₄Cl), tendo sido obtido um rendimento de 0,324 (m/m). A produção em contínuo foi mantida durante três meses, com o intuito de testar a estabilidade de *H. mediterranei*. Apesar de, neste caso, o rendimento ter sido inferior, 0,075 (m/m), verificou-se que, de facto, a cultura se manteve estável no que diz respeito ao rendimento e características do polímero produzido.⁵⁷ Don *et al.* (2006) estudaram a produção em semi-contínuo, a partir de glucose e amido como fontes de carbono e azoto, respetivamente. Em 117 horas, obtiveram um conteúdo de PHAs de 48,6% peso seco da biomassa total, para uma concentração celular de 85,8 g/L.³⁶ Koller *et al.* (2007) estudaram a produção de PHAs a partir de açúcares de soro de leite hidrolisado por *H. mediterranei* e verificaram que a glucose é metabolizada mais rapidamente que a galactose.⁸⁷

Verificou-se a probabilidade de o amido, a par da glucose, ser a melhor fonte de carbono para o crescimento de *H. mediterranei*, com foco na produção de PHAs, no entanto, existem algumas reservas ao considerar o amido num processo comercial, por ser demasiado caro.⁵⁷ Embora *H. mediterranei* não possa usar amido nativo, pode recorrer a amido extrusado.⁸⁵ Por exemplo, Huang *et al.* (2006) utilizaram o farelo de arroz extrusado e amido de milho extrusado como fontes de carbono, sem limitação de azoto, numa produção em semi-contínuo, com pH controlado entre 6,9 – 7,1. Os melhores resultados foram obtidos usando ambas as fontes de carbono simultaneamente (1:8 m/m,

respetivamente), tendo-se apurado um conteúdo de PHAs de 77,8% de peso seco da biomassa total para uma concentração celular de 140 g/L.⁸⁵

Apesar da produção de PHAs por *H. mediterranei* ser associada ao crescimento e não exigir limitação nutricional, a imposição de limitação pode melhorar o rendimento do processo. A limitação de azoto é ineficiente,⁵⁷ a limitação de oxigénio poderá prejudicar o crescimento de *H. mediterranei*, e a limitação de magnésio, enxofre ou de potássio não é prática em meios contendo grande quantidade de sais. Alguns autores defendem que a limitação de fosfato, até um mínimo de 0,00375 % (m/v) é fundamental para a acumulação de PHAs em grandes quantidades.⁵⁷ A temperatura ótima para o crescimento para *H. mediterranei* é 45 °C,⁵⁷ contudo é normal recorrer-se a temperaturas inferiores, como 37 °C^{34, 36, 84, 85} ou 38 °C³⁴ para produção de PHAs. Essa estratégia permite duas vantagens:⁸⁵ poupar energia e oxigénio - nomeadamente em culturas de elevada densidade celular, uma vez que temperaturas menores promovem uma maior concentração de oxigénio.³⁴ Também se verificou que, a partir dos 45 °C, o aumento da temperatura conduz a uma diminuição no conteúdo de PHAs.⁵⁷

Está reportado que as *haloarchaea* requerem 200-250 g/L de NaCl para um crescimento ótimo, e lisam quando a concentração salina desce para valores menores que 100 g/L.⁸⁸ A monitorização da condutividade pode ser usada para estimar a concentração total de sais no meio de produção. Huang *et al.* (2006) mantiveram a condutividade entre valores de 3-4 S/m, que afirmam representar aproximadamente concentrações salinas totais na gama 173-230 g/L. Para tal, foi sendo adicionada uma mistura de sais, com uma proporção de sais equivalente ao meio definido inicialmente.⁸⁵ Pensa-se que os valores de condutividade tendem a diminuir devido à diluição que se promove com a adição de meio de alimentação sem sais, e por causa da adsorção dos iões às células.⁸⁶

H. mediterranei tem um elevado potencial para cumprir as exigências da produção em contínuo, referidas anteriormente, já que esta bactéria necessita de meios com concentrações salinas extremas, evitando assim a possibilidade de contaminação.^{36, 57} No entanto, deve ser tido em consideração que os sais necessários ao crescimento de *H. mediterranei* podem corroer os fermentadores usados em larga escala, nomeadamente componentes de aço inoxidável. Este problema poderá ser prevenido recorrendo a materiais inertes de elevada qualidade para a constituição dos biorreactores, por exemplo poli(éter-éter-cetona) (PEEK), vidro, ou cerâmica de nitreto de silício.^{25, 89}

H. mediterranei também excreta um polímero extracelular - exopolissacarídeo (EPS),⁹⁰ o que pode aumentar a viscosidade do meio e assim limitar a difusão de oxigénio e dificultar o crescimento,⁸⁵ ou ainda competir pelas fontes nutricionais com o P(3HB/3HV). Este facto não tem sido referido como um problema para a produção de PHAs nos trabalhos publicados neste tema. Pelo contrário, os EPSs de microrganismos extremófilos são alvo de interesse pelo potencial de apresentarem características novas e capacidades funcionais em condições extremas, podendo ter aplicação nas indústrias alimentar, farmacêutica e de cosmética como emulsionantes, estabilizantes, coagulantes, espessantes e agentes de suspensão.⁹¹ O EPS produzido por *H. mediterranei* foi caracterizado por Antón *et al.* (1988) como um heteropolissacarídeo de natureza ácida maioritariamente constituído por manose.⁹⁰ Parolis *et al.* (1996) determinaram a estrutura do EPS, tendo averiguado uma notável resistência do EPS a valores extremos de pH, temperatura ou salinidade, indicando-o como um polímero interessante para aplicações que exijam um agente espessante muito resistente.^{90, 92}

3.7. CONDIÇÕES OPERACIONAIS

A produção de PHAs pode ser realizada em descontínuo, semi-contínuo e contínuo.⁹³⁻⁹⁵ A abordagem de produção em descontínuo é geralmente aplicada em fases preliminares, para estudos de crescimento de microrganismos potencialmente acumuladores de PHAs. A desvantagem deste processo é que permite a degradação dos polímeros produzidos caso haja escassez de nutrientes, cuja solução é adicionar substrato de uma forma semi-contínua ou contínua.⁹⁵

A produção em semi-contínuo é a estratégia mais utilizada para a produção de PHAs. Esta estratégia permite minimizar os efeitos inibitórios de substratos e de alguns subprodutos, e apresenta como vantagem a obtenção de elevadas densidades celulares com altas produtividades (70 a 80% peso seco em polímero).⁴² Após uma primeira fase de adaptação e crescimento em descontínuo, é realizada alimentação de modo a manter a fonte de carbono em excesso e forçar a limitação nutricional que desencadeia a produção do polímero, em microrganismos com produção não associada ao crescimento.⁹⁶ Os processos em alimentação descontínua com elevada densidade celular têm vantagens para a produção de PHAs, nomeadamente ao possibilitar a redução do volume de cultura, de

resíduos líquidos, dos custos de produção e do investimento em equipamento, comparativamente aos processos com baixa densidade celular. É uma boa estratégia para a manutenção das concentrações de substâncias tóxicas, como alguns percursores, para além de que permitem realizar uma primeira fase de acumulação de biomassa, e depois induzir uma fase de acumulação, com imposição de limitação nutricional.⁵⁶

A produção contínua exige estirpes microbianas produtoras com alguma robustez, e que preferencialmente não necessitem de condições estéreis. Esta configuração permite a troca constante de meio de cultura, garantindo que todos os componentes do meio estão nas concentrações ótimas para a produção. Tem como vantagem a possibilidade de maior controlo do processo e maior produtividade.⁴² A produção de PHAs por cultivo contínuo num biorreator só é possível quando o polímero é sintetizado durante o crescimento celular, e portanto, não é aplicável para a maioria dos microrganismos que produzem PHAs durante a sua fase estacionária de crescimento.⁵⁶ A produção em contínuo é extremamente atraente para a produção em escala industrial, uma vez que a contaminação seja evitada e a estabilidade da estirpe esteja garantida.

3.8. RECUPERAÇÃO DE PHAS

Devido a serem acumulados intracelularmente, o processo de recuperação dos PHAs é crucial para a economia do processo. Os métodos a escolher para separar os PHAs da biomassa residual dependem da produtividade da estirpe, pureza pretendida e disponibilidade dos agentes de separação.²⁴ O procedimento básico para a recuperação de PHAs engloba quase obrigatoriamente passos de centrifugação/sedimentação/floculação/filtração, lise celular, extração com solventes, e no final, cristalização.⁴² Os métodos principais são: extração por solvente (clorofórmio, trifluoroetanol, dicloroetano, carbonato de propileno, diclorometano ou ácido dicloroacético),⁹⁷ digestão química/enzimática, disrupção mecânica ou extração por fluídos supercríticos.⁹⁸ No caso de *H. mediterranei*, a lise dá-se facilmente, após ressuspensão das células em água destilada. Os grânulos de PHAs poderão ser facilmente recolhidos após centrifugação lenta.²⁴ Este facto resulta num procedimento simples para extração de PHAs, diminuindo os passos no processamento “downstream” de recuperação de PHAs e custos associados.^{34, 84, 85}

3.9. APLICAÇÕES DE PHAS

Ainda que mantendo os esforços de elevar a sua competitividade, os PHAs já estão a ser produzidos industrialmente.¹⁹ A aplicação dos diferentes tipos de PHAs depende da sua composição e da respetiva etapa de extração, uma vez que esta pode influenciar a massa molecular e a pureza do biopolímero.²³ A gama de aplicações para os PHAs não se limita a embalagens ou itens de comodidades, mas abrange áreas tão vastas como a agricultura, farmácia e medicina.^{24, 99} Os PHAs poderão substituir os plásticos convencionais na constituição de garrafas, sacos, e filmes ou fibras para materiais de embalagem.¹⁰⁰ Os PHAs poderão também, por exemplo, ser aplicados em papel, papelão ou bandejas de comida para formar uma camada resistente à água como uma alternativa aos filmes de polietileno ou de alumínio.⁸⁵ Com eficiência de custo, PHAs permitem tornar certas superfícies resistentes à água, substituindo produtos atuais não-biodegradáveis.^{101, 102} Nas áreas agroindustriais, PHAs podem ser incorporados em acolchoado de proteção dos solos,³⁶ ou atuar na libertação controlada de inseticidas, evitando a distribuição em larga escala destes químicos.¹⁰³ Nas áreas de farmácia e medicina existe um grande potencial de aplicações, por exemplo: odontologia, válvulas cardíacas, vasos sanguíneos artificiais, implantes ósseos, reparação nervosa, lentes intraoculares revestimento de feridas, material cirúrgico e paramédico descartável, apoio à engenharia de tecidos, e libertação controlada de substâncias ativas, por exemplo libertação de drogas para a promoção da cicatrização de feridas, drogas anti-trombose, anti-infecções e anti-tumorais.^{18, 21, 22, 24,104} Para além disso, como os monómeros de PHAs são moléculas quirais, têm potencial para ser usados como produtos de base para a síntese de antibióticos e outros produtos de química fina.¹⁰⁵ No geral, os PHAs podem inclusive ser incorporados noutros polímeros com o intuito de melhorar as respetivas propriedades.¹⁰⁶

3.10. BIODEGRADAÇÃO AMBIENTAL

No ambiente, os PHAs podem ser completamente convertidos a água e de dióxido de carbono (CO₂) em condições aeróbias, ou a metano em condições anaeróbicas; sob ataque microbiano das comunidades presentes no solo, em recursos hídricos ou efluentes industriais. Em contraste com a utilização de recursos fósseis, onde o carbono fixado outrora no interior da Terra é libertado como CO₂ de forma rápida e inesperada, a degradação de PHAs está perfeitamente incorporada no ciclo natural do carbono.⁶⁷

Uma vez que os PHAs são polímeros sólidos de elevado peso molecular, não sendo, então, possíveis de transportar através da parede celular, muitos microrganismos excretam PHA despolimerases. Estas enzimas adsorvem-se à superfície do material e hidrolisam PHA a oligómeros e monómeros solúveis em água, que são depois usados no metabolismo celular. Por ser extracelular, PHA despolimerase extracelular está mais bem caracterizada que a intracelular pela sua independência dos grânulos e é ubíqua em ambientes naturais, uma vez que não é exclusivamente sintetizada por organismos acumuladores.¹⁰⁷ Os PHAs são biodegradáveis numa ampla faixa de temperaturas, mesmo com um máximo de cerca de 60 °C com níveis de humidade a 55%.¹⁰⁸

Estudos de biodegradação de P(3HB/3HV) em diferentes ambientes verificaram que a velocidade de degradação foi maior em ambientes anaeróbios que em aeróbios, e que a biodegradação em água do mar foi mais demorada (Tabela 4).¹⁰⁹

Os tempos de biodegradação dos PHAs foram sempre inferiores aos estimados para os plásticos de base petroquímica. Estimativas para a longevidade dos plásticos convencionais apresentam conclusões variáveis, mas acredita-se que esteja na faixa de centenas ou mesmo milhares de anos, dependendo das propriedades físicas e químicas do polímero.¹¹⁰

Tabela 3: Biodegradação de um filme de P(3HB/3HV) com 1 mm de espessura, considerando diferentes ambientes.¹⁰⁹

Ambiente	100 % Perda de massa (semanas)
Sedimentos estuarinos	40
Solo	75
Água do mar	350
Águas residuais (ambiente anaeróbio)	6
Águas residuais (ambiente aeróbio)	60

Arcos-Hernandes *et al.* (2012) estudaram a biodegradação em solo de filmes de P(HB/HV) produzido por lamas ativadas, e definiram uma modelação dos dados que permitiu estimar que estes sofreriam uma perda de massa de 50% num prazo de 3,3 a 4,4 meses, e 90% num prazo de 10,7 a 22,2 meses. Os autores acreditam que estes resultados associados a um estudo minucioso das cinéticas de degradação são um importante ponto de partida para que se possam produzir produtos de P(3HB/3HV) para aplicações na agricultura, mediante ajuste às condições específicas do cultivo e respetiva sazonalidade.¹¹¹ Em ambientes naturais, a velocidade de degradação é influenciada pela população microbiana, por exemplo na especificidade da PHA despolimerase; condições ambientais como temperatura, humidade, pH e condições nutricionais; e ainda características dos PHAs como composição, cristalinidade, aditivos e área superficial.^{42, 112} Por isso, é necessário acompanhar a entrada de produtos de PHAs no mercado com uma noção mais aproximada da realidade da biodegradabilidade desses produtos. A biodegradação de embalagens de P(3HB/3HV) em lamas ativadas aeróbias, durante 10 semanas, a uma temperatura média de 20 °C, ocorreu conforme ilustrado na Figura 4.³³

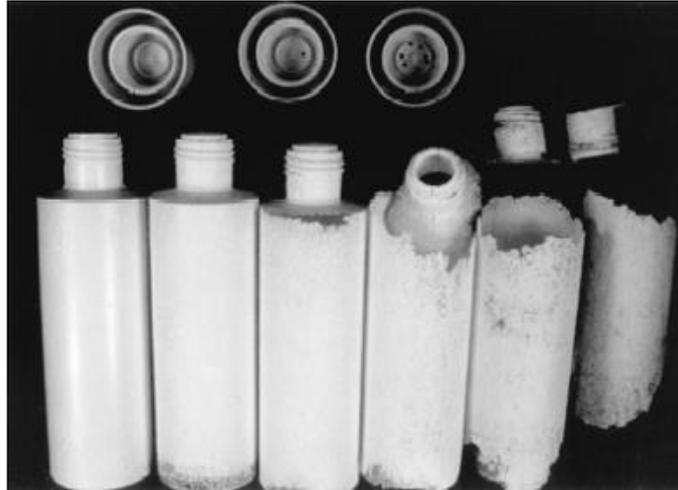


Figura 4: Embalagens de P(3HB/3HV) incubadas em lamas ativadas aeróbias durante 0, 2, 4, 6, 8 e 10 semanas (da esquerda para a direita), numa temperatura média de 20°C.³³

A biocompatibilidade e biodegradabilidade *in vivo* de P(3HB), torna-o um material útil para muitas aplicações biomédicas. Em tecidos animais, a biodegradação de P(3HB) é realizada sob ação de esterases não-específicas presentes nos tecidos. A Figura 5 ilustra a biodegradação *in vivo* de um filme de P(3HB), para um intervalo de tempo de 3 meses.¹¹³

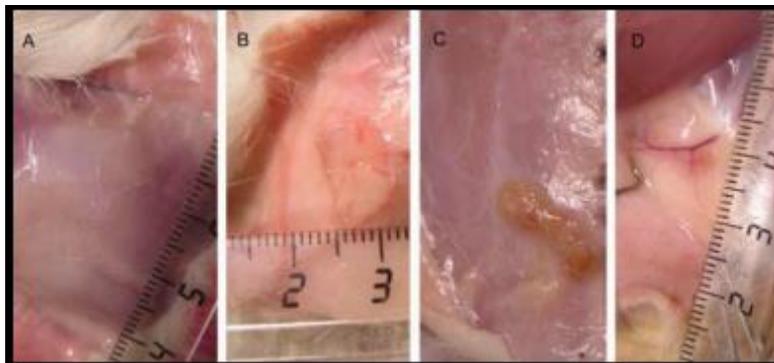


Figura 5: Biodegradação de um filme de P(3HB) (50µm espessura) implantado subcutaneamente num rato Wistar. (A) 0,5 meses, 98% peso residual do filme; (B) 2,0 meses, 94% peso residual; (C) 2,5 meses, 28% peso residual; (D) 3,0 meses, 0% peso residual.¹¹³

3.12. SUSTENTABILIDADE E IMPACTO AMBIENTAL

Antes de apostar na implementação industrial deve ser avaliado o impacto do produto, num contexto ambiental, mediante a Análise do Ciclo de Vida (ACV). Deve imperar a noção de que uma avaliação holística íntegra exige a avaliação da produção desde a obtenção da matéria-prima, passando pela fabricação, distribuição e utilização, até à eliminação do produto, incluindo todas as necessidades de transporte - etapas que constituem o Ciclo de Vida do produto.⁶⁷ Conhecer o Ciclo de Vida do produto e as necessidades inerentes é essencial, pois pode permitir o planeamento da produção, definir a continuidade de um processo, ou motivar a sua reformulação. A produção microbiana de PHAs tende a revelar-se vantajosa considerando que emite menos carbono e apresenta um menor gasto energético comparativamente à produção de plásticos petroquímicos.¹¹⁴

No entanto, as perspetivas económicas da produção microbiana de PHAs, como tem vindo a ser referido, são pouco competitivas.⁴ Algumas ACVs realizadas a determinadas estratégias de produção microbiana de PHAs não revelam sustentabilidade superior e compensatória relativamente à produção dos polímeros sintéticos convencionais.¹¹⁵ No entanto, deve-se atentar que a produção dos plásticos petroquímicos já está satisfatoriamente desenvolvida, enquanto a produção de PHAs ainda carece de otimização.

4. FOLHELHO DE UVA

A agricultura gera quantidades significativas de subprodutos que geralmente não são intrinsecamente perigosos, mas cujo elevado teor de matéria orgânica aliado à produção sazonal e conseqüente concentração de determinados resíduos num período do ano cria dificuldades de gestão e coloca potenciais problemas de poluição. A utilização eficiente dos resíduos da indústria agroalimentar é essencial não só para minimizar o impacto ambiental, mas também para reforçar a rentabilização do setor segundo o conceito de biorrefinaria.¹¹⁶

A uva é dos frutos mais produzidos no mundo, circulando essencialmente no mercado de vinho, sumos e passas.¹¹⁷ A área mundial de cultivo de vinhas, principalmente *Vitis vinífera*, é de aproximadamente 8 milhões de hectares, produzindo mundialmente cerca de 70 milhões de toneladas anuais de uvas, das quais 80% são destinados à produção

de vinho.¹¹⁸ Os subprodutos da vinificação são o bagaço, as borras e os sarros. O bagaço, sólido residual remanescente após a prensagem da uva, é tipicamente uma mistura heterogénea genericamente composta por 50% de folhelho, 25% sementes (grainhas) e 25% de caules (engaço), sendo o resíduo mais abundante gerado no processo de vinificação.¹¹⁹ Uma vez que 20% a 25% do peso da uva processada permanece como bagaço, cerca de 11 a 14 milhões de toneladas de bagaço de uva são produzidos no mundo anualmente.^{118, 120} Considerando estes valores, estima-se que sejam produzidos grosso modo 6 milhões de toneladas de folhelho de uva anualmente em todo o mundo.

De acordo com a prática convencional, o bagaço de uva é descartado ou utilizado em alimentação animal ou como adubo, sem qualquer pré-tratamento.¹²¹ Um dos principais problemas ambientais relacionados com a gestão destes resíduos é a geração de grandes quantidades durante um curto período do ano, assim como algumas características poluentes como pH baixo e um alto teor de compostos fenólicos fitotóxicos e antibacterianos, que resistem à degradação biológica.¹²² A sazonalidade dos subprodutos da vinificação impõe a definição de estratégias que permitam a acumulação destes a baixo custo, uma vez que para o processamento de tão grande quantidade de resíduos num curto espaço de tempo exigiria grandes instalações, caras de construir e que funcionariam em capacidade total apenas em períodos muito curtos. Idealmente, estes subprodutos deverão ser convertidos de antemão em intermediários estáveis que possam ser armazenados sem requerer manutenção ou gastos energéticos elevados.¹²³

Do ponto de vista químico, este subproduto é rico em álcoois, ácidos, aldeídos, ésteres, pectinas, polifenóis, minerais, açúcares e fibras, apresentando por isso um elevado potencial de valorização.^{124, 125} Investigação recente demonstrou que uma grande variedade de produtos de valor acrescentado pode ser obtida por tratamento dos componentes do bagaço de uva usando processos químicos e/ou biotecnológicos.^{122, 126} Entre estes subprodutos, deve ser realçado o folhelho de uva devido ao seu teor significativo em moléculas como antocianinas, flavan-3-óis, flavonóis, ácidos hidroxibenzoicos e hidroxiestilbenos, sendo por isso considerados uma fonte potencial para o isolamento de compostos naturais.^{127, 128}

Folhelho de uva é essencialmente a designação dada às películas das uvas prensadas na vinificação, após desidratação e separação das grainhas e engaço. É essencialmente constituído por polissacarídeos estruturais (celulose e hemicelulose),

proteínas, taninos, açúcares (principalmente glicose e frutose), lípidos (ácidos gordos, ceras) e minerais.¹²¹ A composição do folhelho é complexa e varia consoante a casta da videira e as condições geoclimáticas da região onde são cultivadas, variando principalmente a um nível primário entre as uvas tintas e brancas.¹²⁷

As uvas tintas estão inteiramente envolvidas no processo de fermentação e o folhelho resultante contém muito menos celulose e açúcares residuais do que o folhelho de uvas brancas, uma vez que as uvas brancas são prensadas mecanicamente para produzir sumo e não são submetidas à fermentação alcoólica.¹²⁹ Esta característica é atraente para a eventual utilização do folhelho de uvas brancas como substrato em produções microbianas.

Mendes *et al.* (2013) determinaram a composição química geral do folhelho de uvas brancas (várias castas) de acordo com a Tabela 4.³ A análise aos açúcares neutros foi realizada após uma extração prévia com diclorometano. Adicionalmente também analisaram o extrato aquoso de folhelho (EAF) de uvas brancas para a composição de monossacarídeos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, de “High-Performance Liquid Chromatography”), tendo apurado o perfil apresentado na Tabela 5, para uma concentração de açúcares totais de 44,15 g/L, em média. Em menor quantidade, também poderão estar presentes proteínas, glucanomananas, oligossacarídeos e taninos.³

O EAF de uvas brancas já foi utilizado com sucesso como substrato para a produção de celulose bacteriana e bioetanol.^{3, 130}

Tabela 4: Composição química do folhelho de uvas brancas (várias castas), segundo Mendes *et al.*.³

Componentes	Abundância Relativa (% resíduo seco)
Cinzas	18,3
Extratáveis	
Diclorometano	2,4
Hexano	1,3
Água	48,0
Celulose (<i>Kürschner-Hoffer</i>)	12,5
Proteínas	6,7
Taninos	3,4
Açúcares neutros	
Ramnose	1,2
Fucose	0,4
Arabinose	3,1
Xilose	7,2
Manose	4,2
Galactose	33,1
Glucose	50,8

Tabela 5: Abundância relativa de monossacarídeos livres no extrato aquoso do folhelho de uvas brancas (várias castas).³

Monossacarídeo	Abundância relativa no extrato aquoso (%)
Galactose	46,2
Glucose	43,4
Frutose	5,5
Arabinose	3,5
Manose	1,1
Xilose	0,3

CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS

1. EXTRATO AQUOSO DE FOLHELHO DE UVA

Neste trabalho foi utilizado folhelho de uva branca, fornecido pela Quinta do Serrado, Penalva do Castelo, Portugal. O extrato aquoso do folhelho de uva (EAF) foi obtido por extração aquosa do folhelho de uva, numa proporção de 1 g de folhelho/10 ml de água, em ebulição durante 4 horas, seguido de uma decantação.

2. MICRORGANISMOS

Neste trabalho foram utilizados os microrganismos *Cupriavidus necator* B-4383 (gentilmente cedido pela coleção de culturas do “Agricultural Research Service” do Departamento de Agricultura do Governo Norte-Americano); e *Haloferax mediterranei* DSM 1411 (adquirido à Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares, DSMZ - *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*).

As estirpes de *C. necator* e *H. mediterranei* foram recebidas liofilizadas, tendo sido reavivadas segundo as instruções que as acompanhavam. O “pellet” recebido foi transferido para 25 mL de meio adequado (LB para *C. necator*, e DSMZ372 para *H. mediterranei*) e incubado durante 96 horas, nas condições indicadas para cada microrganismo (28 °C e 150 rpm para *C. necator*, e 37 °C e 180 rpm para *H. mediterranei*).

A partir das culturas reavivadas foram preparadas amostras para criopreservação. Alíquotas de 2 mL foram centrifugadas a 13000 rpm, durante 30 segundos, e o sobrenadante foi descartado. O “pellet” foi ressuscitado em 600 µL de meio fresco com 15% de glicerol. Por fim, os preparados foram congelados a -80 °C em “crio-vials” estéreis.

As linhagens das estirpes utilizadas neste trabalho foram mantidas em placas de Petri com meio sólido adequado (LB para *C. necator*, e DSMZ372 para *H. mediterranei*), através de repicagens mensais, mediante crescimento durante 72 horas, a temperatura adequada (28 °C para *C. necator* e 37 °C para *H. mediterranei*), e posterior conservação sob refrigeração a 4 °C.

3. MEIOS DE CULTURA

Para a preparação dos meios, os respectivos componentes foram dissolvidos em água destilada, e o pH foi acertado aos valores indicados. Os meios de cultura, bem como todo o material necessário na preparação dos mesmos e no manuseamento das culturas foram esterilizados em autoclave durante 21 minutos a 121 °C.

3.1. MEIOS DE CULTURA PARA *C. necator*

Para o estudo de *C. necator* foram usados o meio Luria-Bertani, LB, e o meio definido.

3.1.1. Meio Luria-Bertani, LB

O meio LB (Tabela 6) foi usado na sua forma líquida para reavivar a cultura liofilizada e para o arranque dos pré-inóculos e, na sua forma sólida, para os plaqueamentos.

Tabela 6: Composição do meio de cultura LB.

Nome do composto	Concentração (g/L)
Triptona	10,0
Extrato de levedura	5,00
Cloreto de sódio (NaCl)	10,0
Agar (para meios sólidos)	15,0

3.1.1.1. Meio definido para *C. necator*

O meio definido foi utilizado nos ensaios com *C. necator*, incluindo os ensaios em EAF. O meio foi elaborado de acordo com a composição das Tabela 7 e Tabela 8. O pH do meio foi ajustado a 6,8. Na preparação do meio definido, a solução de fosfatos e a solução de cloreto de ferro foram preparadas e autoclavadas em separado e posteriormente reunidas com os restantes constituintes do meio, em condições assepsia.

Na preparação do meio EAF, o extrato aquoso foi suplementado com os constituintes do meio definido, com exceção da fonte de carbono.

Tabela 7: Composição do meio de cultura definido para *C. necator*.

Nome do composto	Fórmula química	Quantidade para 1L de meio
Fosfato de potássio	KH_2PO_4	2,30g
Fosfato de sódio	Na_2HPO_4	2,30g
Cloreto de amónia	NH_4Cl	1,00g
Sulfato de magnésio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,50g
Hidrogenocarbonato de sódio	NaHCO_3	0,50g
Cloreto de cálcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10,0mg
Citrato de amónia	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7(\text{NH}_4)_2$	22,2mg
Glucose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	20,0g
Cloreto de ferro	FeCl_3	30,0mg
Solução de micronutrientes*	—	5,00mL

*Composição descrita na Tabela 8.

Tabela 8: Composição da solução de micronutrientes.

Nome do composto	Fórmula química	Concentração (g/L)
Sulfato de zinco heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,10
Cloreto de manganês tetrahidratado	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,03
Ácido bórico	H_3BO_3	0,30
Cloreto de cobalto hexahidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,20
Cloreto de cobre dihidratado	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01
Cloreto de níquel hexahidratado	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02
Molibdato de sódio	Na_2MoO_4	0,03

3.1.2. Meios de cultura para *H. mediterranei*

Para o estudo de *H. mediterranei* foram utilizados o meio DSMZ372 e o meio usado por Fang *et al.* (2010),¹³¹ designado meio Fang2010.

3.1.2.1. Meio de cultura DSMZ372

O meio DSMZ372 (Tabela 9) foi usado na sua forma líquida para reavivar a cultura liofilizada e para o arranque dos pré-inóculos e, na sua forma sólida, para os plaqueamentos. O pH do meio foi ajustado à gama 7,0 – 7,2.

Tabela 9: Composição do meio DSMZ372.

Composto	Fórmula química	Quantidade para 1L de meio
Extrato de levedura	-	5,00g
Hidrolisado ácido de caseína (“Casamino acids”)	-	5,00g
Glutamato de sódio	C ₅ H ₈ NNaO ₄	1,00g
Cloreto de potássio	KCl	2,00g
Citrato de sódio	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	3,00g
Sulfato de magnésio heptahidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	20,00g
Cloreto de sódio	NaCl	200,0g
Cloreto de ferro (II) tetrahidratado	FeCl ₂ .4H ₂ O	36,0mg
Cloreto de manganês (II) tertahidratado	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,36mg
Agar	-	20,00g

3.1.2.2.Meio de cultura Fang2010

O meio utilizado por Fang *et al.*, 2010 (Tabela 10) foi utilizado nos ensaios com *H. mediterranei*, incluindo os ensaios em EAF, nos quais os componentes do meio foram suplementados ao extrato aquoso, com exceção da fonte de carbono. O pH do meio foi acertado a 7,0.

Tabela 10: Composição do meio Fang2010.

Composto	Fórmula	Quantidade para 1L de meio
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	1%
Cloreto de sódio	NaCl	156,0g
Cloreto de magnésio hexahidratado	MgCl ₂ .6H ₂ O	13,00g
Sulfato de magnésio heptahidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	20,00g
Cloreto de cálcio hexahidratado	CaCl ₂ .6H ₂ O	1,00g
Cloreto de potássio	KCl	4,00g
Hidrogenocarbonato de sódio	NaHCO ₃	0,20g
Brometo de sódio	NaBr	0,50g
Extrato de levedura	-	5,00g

4. ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE PHAS

4.1. ENSAIOS COM *C. necator*

4.1.1. Pré-inóculos

Os pré-inóculos foram realizados em “Erlenmeyers” de 100 mL e preparados de acordo com a Tabela 11, mediante a transferência sequencial do volume assinalado entre pré-inóculos, após o tempo indicado de incubação a 150 rpm e 28 °C.

Tabela 11: Condições de preparação dos pré-inóculos para os crescimentos de *C. necator*.

Pré-inóculo	Condições (inoculação/horas de incubação)
1	1 colónia + 25mL meio LB 72 horas
2	1mL Pré-inóculo1 + 30mL meio LB 24 horas
3	1mL Pré-inóculo2 + 30mL meio do ensaio 48 horas

4.1.2. Crescimentos em “Erlenmeyer”

Para os ensaios de crescimento de *C. necator* em “Erlenmeyer” foi transferido um volume do pré-inóculo 3 de modo a que o valor de absorvância a 650nm inicial dos ensaios rondasse os 0,200 em meio definido e 0,400 em EAF. Os ensaios foram realizados em “Erlenmeyers” de 250 mL, com 100 mL de volume de trabalho. Os testes foram monitorizados mediante amostragem periódica até à definição inequívoca da fase estacionária. Para cada amostra recolhida foi medido o pH (Hanna Instruments - pH 211 Microprocess pH Meter, HI 1131 pH Electrode) e a absorvância a 650 nm (UVmini-1240, Shimadzu), e feita a quantificação de açúcares e PHAs. Foram também retiradas amostras para análise por microscopia de fluorescência. No final da monitorização do ensaio, foi feita a extração do polímero da cultura restante, e os filmes obtidos foram posteriormente analisados por FTIR.

4.1.3. Crescimentos em reator

Foi estudada a produção de *C. necator* em EAF em descontínuo num reator B. Braun BioLab de 1 L. O reator foi operado a partir de um volume inicial de 600 mL (EAF diluído 1:2), a 28 °C e 150 rpm. A taxa de arejamento foi sendo ajustada de modo a manter os níveis de oxigénio entre 20 a 30% O₂. O pH da cultura foi mantido a 6,8 por suplementação do meio com KOH 1,5M ou H₂SO₄ 1,5M. A amostragem foi efetuada durante 24 horas, para leituras de absorvância a 650 nm, análise dos açúcares e quantificação de PHAs.

4.2. ENSAIOS COM *H. MEDITERRANEI*

4.2.1. Pré-inóculos

Os pré-inóculos foram realizados em “Erlenmeyers” de 100 mL e preparados de acordo com a Tabela 12, mediante a transferência sequencial do volume assinalado entre pré-inóculos, após o tempo indicado de incubação a 180 rpm e 37 °C.

Tabela 12: Condições de preparação dos pré-inóculos para os crescimentos de *H. mediterranei*.

Pré-inóculo	Condições (inoculação/horas de incubação)
1	1 colónia + 20mL meio DSMZ372 96 horas
2	5mL Pré-inóculo1 + 25mL meio DSMZ372 48 horas
3	5mL Pré-inóculo2 + 25mL meio Fang2010 1% 48 horas
4	5mL Pré-inóculo3 + 25mL meio do ensaio 96 horas

4.2.2. Crescimentos em “Erlenmeyer”

Para os ensaios de crescimento de *H. mediterranei*, foi transferido um volume do pré-inóculo 4 de modo a que o valor de absorvância inicial a 520 nm rondasse os 0,200 em meio definido e 0,400 em EAF. Os ensaios foram realizados em “Erlenmeyers” de 250 mL, com 100 mL de volume de trabalho. Os testes foram monitorizados até à definição inequívoca da fase estacionária, mediante amostragem periódica. Para cada amostra recolhida foi medido o pH (Hanna Instruments - pH 211 Microprocess pH Meter, HI 1131 pH Electrode) e a absorvância a 520 nm (UVmini-1240, Shimadzu), e feita a quantificação

de açúcares e PHAs. Foram também retiradas amostras para análise por microscopia de fluorescência. No final da monitorização do ensaio, foi feita a extração do polímero da cultura restante, e os filmes obtidos foram posteriormente analisados por FTIR.

5. EXTRAÇÃO DO POLÍMERO

No final da monitorização do ensaio, a cultura restante foi centrifugada a 5000 rpm, 20 minutos e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” de biomassa foi ressuspendido numa solução de NaCl 0,9%, no caso de *C. necator*. Centrifugações e lavagens foram repetidas duas vezes, ou mais se necessárias. Por fim o sobrenadante de lavagem foi descartado e a biomassa foi ressuspendida em 30 mL de clorofórmio. As amostras foram transferidas para “Erlenmeyers” esmerilados tapados e incubadas a 30 °C, 200 rpm, durante dois a três dias. Por fim, uma filtração em vácuo permitiu remover os resíduos de biomassa, e o clorofórmio filtrado foi evaporado, formando-se um filme de PHA. No caso de *H. mediterranei*, foi usada uma solução de NaCl 10% nas lavagens sequenciais, e água destilada na lavagem imediatamente anterior à adição de clorofórmio.

6. MÉTODOS EXPERIMENTAIS E ANALÍTICOS

6.1. QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA

Para a quantificação da biomassa foi relacionada a absorvância (650 nm para *C. necator* e 520 nm para *H. mediterranei*) com a concentração de biomassa, através de uma reta de calibração. Esta foi elaborada mediante a determinação do peso seco e leituras de absorvância de várias diluições relativamente a uma cultura líquida na fase de desaceleração. Para a determinação do peso seco, 5 mL de amostra foram filtrados em vácuo, através de membranas de nitrocelulose (27 mm de diâmetro, 0,2 µm diâmetro de poro) previamente pesadas. Depois de lavadas (15 mL de água destilada no caso de *C. necator*, e NaCl 10% para *H. mediterranei*), as membranas foram colocadas numa estufa a 100 °C durante 72 horas, após as quais foram pesadas.

6.2. QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES NO EXTRATO AQUOSO DE FOLHELHO

A quantificação de açúcares neutros foi realizada por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID, do inglês “Gas Chromatography - Flame Ionization Detector”), após a hidrólise das amostras e derivatização dos açúcares a acetatos de alditol. A amostra foi hidrolisada por tratamento de 200 μL de EAF com 400 μL de H_2SO_4 72% a temperatura ambiente durante 3 horas, seguido de adição de 4,4 mL de H_2O e incubação a 100 $^\circ\text{C}$ durante 2h30. Ao hidrolisado arrefecido adicionaram-se 200 μL de 2-desoxiglucose (20 mg/mL) como padrão interno. A 1 mL desta solução adicionou-se 200 μL de NH_3 25% e 100 μL de uma solução de NH_3 3M contendo 150 mg/mL de NaBH_4 , e incubou-se a 30 $^\circ\text{C}$ durante 1 hora, ocorrendo a redução dos monossacarídeos a alditóis. Para a decomposição do excesso de NaBH_4 , adicionaram-se duas vezes 50 μL de ácido acético glacial. A 0,3 mL desta solução adicionou-se 0,45 mL de 1-metilimidazol e 3 mL de anidrido acético, mantendo-se a 30 $^\circ\text{C}$ durante 30 minutos, para a acetilação dos alditóis. Os acetatos de alditol foram seguidamente extraídos com diclorometano e esta fase orgânica foi lavada várias vezes com água. O solvente foi evaporado sob atmosfera de azoto. Por duas vezes, adicionou-se 1 mL de acetona anidra e repetiu-se o processo de evaporação. O resíduo seco foi dissolvido em 100 μL de acetona anidra e 0,5 μL foram injetados num cromatógrafo de gás Varian 3350 Focus GC-FID (Thermo Scientific), equipado com uma coluna capilar DB-225 J&W (30 m \times 0,25 mm diâmetro interno, com 0,15 μm de espessura de filme) e detetor de ionização de chama, usando N_2 como gás de arraste, com as seguintes condições cromatográficas: temperatura do injetor 225 $^\circ\text{C}$, temperatura da coluna 220 $^\circ\text{C}$ e temperatura do detetor 250 $^\circ\text{C}$.

6.3. QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES POR HPLC

A quantificação dos monossacarídeos presentes no meio de cultura nos ensaios foi feita por HPLC. Prepararam-se diferentes padrões para a determinação das retas de calibração. As amostras foram preparadas mediante filtração de 800 mL em “ependorfs” com filtro de diâmetro de poro de 0,22 μm a 10000 rpm durante 15 minutos (MiniSpin Eppendorf). As amostras e os padrões foram analisados numa coluna de HPLC (HPLC Hitachi, coluna Knauer EurokatH10, forno Gecko 2000 40 $^\circ\text{C}$, detetor de índice de refração (RI) Hitachi L-2490), a uma temperatura de 40 $^\circ\text{C}$, durante 60 minutos, com eluente H_2SO_4 0,01N a um caudal de 0,4 mL/min.

6.4. QUANTIFICAÇÃO DE PHAS POR CROMATOGRAFIA GASOSA (GC)

A concentração de PHAs foi determinada por GC-FID utilizando o método de Lemos (2006) adaptado.¹³² A biomassa liofilizada foi incubada a 100 °C durante 3,5 horas com soluções de heptadecano (padrão interno) dissolvido em clorofórmio numa proporção de 1:1, e metanol ácido (20%). Após o passo de digestão, a fase orgânica de cada amostra foi extraída e injetada num cromatógrafo de gás com detetor de ionização de chama (GC-FID, Bruker 400-GC). Foi usada uma coluna Bruker BR-SWAX (30m×0,25mm×0,25µm) utilizando hidrogénio como gás de arraste (14,5 Psi). Foi utilizado um split de injeção de 0,50 µL a 280 °C com uma proporção de split de 1:5. O programa de temperaturas do forno foi o seguinte: 40 °C; 20 °C/min até 100 °C; 3 °C/min até 155 °C; 20 °C/min até 220 °C. A temperatura do detetor foi de 250 °C. A calibração de 3HB e 3HV foi efetuada mediante a utilização de padrões do polímero comercial P(3HB/3HV), (88%/12%, Aldrich).

7. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Foi aplicada a técnica de coloração Azul de Nilo às amostras recolhidas ao longo do tempo, de forma a averiguar a acumulação de PHAs através de microscopia de fluorescência. Após os procedimentos descritos nas secções imediatamente seguintes (adaptados da metodologia descrita por Ostle e Holt, 1982),¹³³ uma alíquota da amostra preparada foi colocada numa lamela para visualização ao microscópio (AXIO Imager; lentes Zeiss e shutter HXP 120C).

Nos casos em que não foi possível realizar a análise microscópica no dia em que foi retirada a amostra, procedeu-se à fixação das células (Secção 7.1.3), para posterior coloração e análise.

7.1.1. Metodologia de Coloração Azul de Nilo para *C. necator*

A 1mL de amostra adicionaram-se 5 µL de solução de Azul de Nilo, incubando numa estufa a 55 °C, durante 10 minutos. Submeteu-se a amostra a sucessivas centrifugações (5000 rpm, 5 minutos) mediante descarte sistemático do sobrenadante seguido de ressuspensão em 1 mL de NaCl 0,9%, posterior lavagem em 2 mL de ácido acético 8% (com agitação no vortex), e última ressuspensão em 500 µL de NaCl 0,9%.

7.1.2. Metodologia de Coloração Azul de Nilo para *H. mediterranei*

A 1mL de amostra adicionaram-se 50 μ L de solução de Azul de Nilo, incubando numa estufa a 55 °C, durante 15 minutos. Submeteu-se a amostra a sucessivas centrifugações (3000 rpm, 5 minutos) mediante descarte sistemático do sobrenadante seguido de ressuspensão em 0,5 mL de NaCl 10%, posterior lavagem em 2 mL de ácido acético 8% em NaCl 10% (com agitação no vortex), e última ressuspensão em 500 μ L de NaCl 10%.

7.1.3. Fixação da biomassa

Uma amostra de 1mL foi centrifugada a 13000 rpm, durante 2 minutos. O “pellet” de biomassa resultante foi submetido a entre duas a três lavagens sucessivas mediante descarte do sobrenadante, ressuspensão em tampão PBS e centrifugação a 8000 rpm e 5 minutos. Após descarte do sobrenadante da última lavagem, adicionou-se 1 mL de tampão PBS e 1 mL de paraformaldeído, e reservou-se a 4 °C. No dia seguinte, os preparados foram centrifugados a 13000 rpm durante 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e 1 mL de tampão PBS e 1 mL de etanol absoluto foram adicionados. As células deste modo fixadas foram congeladas até ao dia da visualização ao microscópio.

8. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER COM REFLEXÃO TOTAL ATENUADA

Os filmes de PHA obtidos foram caracterizados por espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada, FTIR-ATR (Mattson-7000, com uma resolução 4cm^{-1} , 256 scans), numa gama de comprimentos de onda entre os 4000 e os 500cm^{-1} .

9. TRATAMENTO DE DADOS

A concentração de biomassa residual ($[X_{\text{res}}]$, g/L) foi calculada subtraindo a concentração de polímero acumulado ($[PHA]$, g/L) à concentração de biomassa determinada ($[X]$, g/L), num dado momento:

$$X_{\text{res}} = X - [PHA] \quad (\text{Equação 1})$$

De forma a obter a taxa específica de crescimento foi necessário partir da equação que descreve o crescimento microbiano:

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (\text{Equação 2})$$

Por integração e linearização da Equação 2 foi obtida a Equação 3:

$$\ln(X_0) = \mu \cdot t + \ln(X_i) \quad (\text{Equação 3})$$

onde X é a concentração de biomassa e t é o tempo. A integração do tempo foi feita entre 0, que corresponde ao início da fase exponencial, e t , que corresponde ao instante final da fase exponencial. A estes momentos correspondem duas concentrações de biomassa distintas, X_0 e X_i respetivamente. A integração foi feita na fase exponencial uma vez que nesse intervalo de tempo a taxa específica de crescimento é máxima. A Equação 3 obtida é da forma $y = mx + b$, e a taxa específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) corresponde ao declive da reta (m).

A taxa de consumo de substrato, r_s , foi calculada a partir da variação da concentração de substrato (ΔS) ao longo do tempo (Δt):

$$r_s = -\frac{\Delta S}{\Delta t} \quad (\text{Equação 4})$$

A taxa de formação de produto, r_p , foi calculada a partir da variação da concentração de PHA (ΔP) ao longo do tempo (Δt):

$$r_p = \frac{\Delta P}{\Delta t} \quad (\text{Equação 5})$$

O rendimento produto/biomassa observado, $(Y_{P/X})_{obs}$, foi calculado a partir da variação da concentração de PHA (ΔP) e da variação da concentração de biomassa (ΔX) no meio:

$$(Y_{P/X})_{obs} = \frac{\Delta P}{\Delta X} \quad \text{(Equação 6)}$$

O rendimento produto/substrato observado, $(Y_{P/S})_{obs}$, foi calculado a partir da variação da concentração de PHA (ΔP) e da variação da concentração de açúcares (ΔS) no meio:

$$(Y_{P/S})_{obs} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad \text{(Equação 7)}$$

De modo a estimar a %PHA com base na massa de polímero extraído, foi relacionado a massa do filme com a quantidade de biomassa da qual foi obtido, de acordo com a Equação 8. A quantidade de biomassa foi calculada do valor de concentração de biomassa e volume utilizado.

$$\%PHA = \frac{m(\text{filme})}{m(\text{biomassa})} \times 100 \quad \text{(Equação 8)}$$

O conteúdo em PHA (%PHA) foi calculado a partir da concentração de PHA ([PHA] g/L) e da concentração de biomassa ([X] g/L) no meio:

$$\%PHA = \frac{[PHA]}{[X]} \times 100 \quad \text{(Equação 9)}$$

CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHELHO

O conteúdo em monossacarídeos do EAF utilizado neste trabalho foi determinado e está descrito na Tabela 13. O EAF de uvas brancas da casta Touriga Nacional difere na composição em monossacarídeos relativamente à composição descrita por Mendes *et al.* (2013) para o EAF de uvas brancas de várias castas (“mixed varieties”).³ O EAF de várias castas, anteriormente descrito, contém galactose como principal constituinte (abundância relativa 46,2%) de uma concentração de açúcares totais de 44,15 g/L, em média.³ O EAF da casta Touriga Nacional utilizado neste trabalho contém glucose como açúcar mais abundante, e uma quantidade de galactose muito inferior (abundância relativa 0,60%). A diferença nesta proporção pode ser explicada pela diferença entre castas.¹²⁷ O facto do EAF de Touriga Nacional apresentar uma concentração inferior de açúcares totais, 19,16 g/L deve-se ao facto de não ter sido concentrado.

Para os ensaios de produção de PHAs utilizando *C. necator* e *H. mediterranei* realizados em meio sintético foram considerados apenas os principais monossacarídeos: glucose ($14,373 \pm 0,6284$ g/L) e manose ($4,197 \pm 0,2032$ g/L).

Tabela 13: Concentração e abundância relativa de monossacarídeos no extrato aquoso do folhelho de uvas brancas da casta Touriga Nacional.

Monossacarídeo	Concentração (g açúcar/L EAF)	Abundância relativa, % (m açúcar/m açúcares totais)
Ramnose	$0,104 \pm 0,0058$	0,54
Ribose	$0,081 \pm 0,0087$	0,42
Arabinose	$0,280 \pm 0,0248$	1,46
Xilose	$0,010 \pm 0,0009$	0,06
Manose	$4,197 \pm 0,2032$	21,91
Galactose	$0,114 \pm 0,0053$	0,60
Glucose	$14,373 \pm 0,6284$	75,01

2. ENSAIOS COM *C. NECATOR*

2.1. ENSAIO PRELIMINAR EM MEIO SINTÉTICO

De modo a verificar a capacidade de *C. necator* em utilizar os açúcares presentes no EAF para crescimento e produção de PHAs, foi realizado um ensaio (Figura 6) em meio definido com glucose e manose (meio MG), os principais açúcares constituintes de EAF.

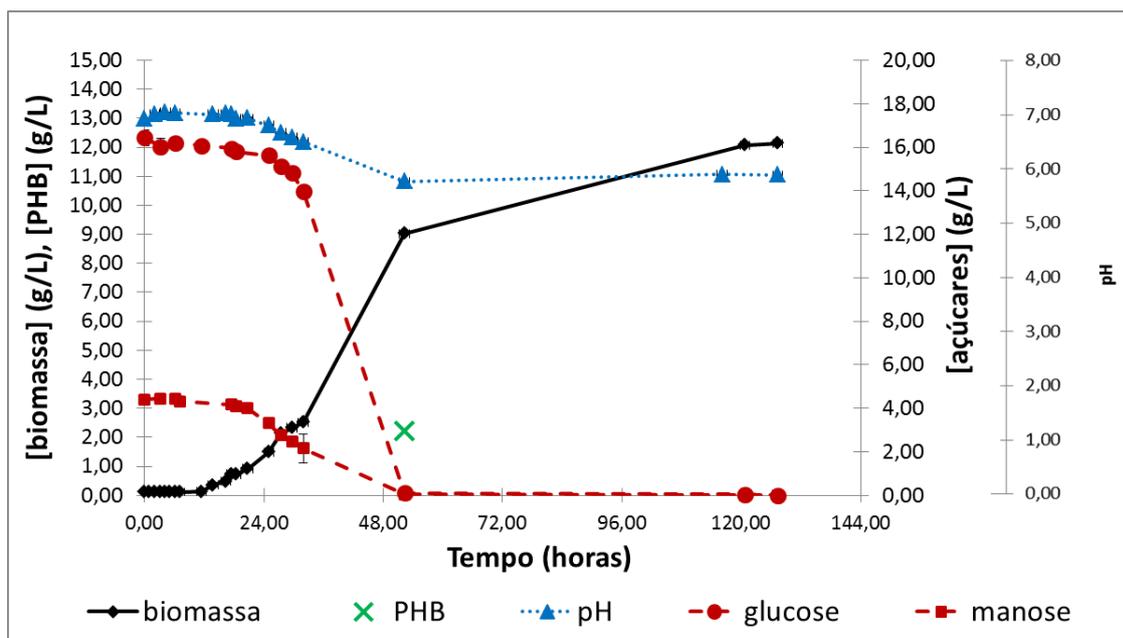


Figura 6: Variação de pH, concentração de biomassa, P(3HB), glucose e manose, durante o ensaio preliminar de crescimento de *C. necator* em meio sintético MG.

A concentração inicial de biomassa foi de 0,13 g/L. Após 13,75 horas de fase lag, a biomassa arrancou em fase exponencial de crescimento com uma taxa específica de crescimento da biomassa total ($\mu_{\text{máxX}}$) de $0,06 \text{ h}^{-1}$. A monitorização do ensaio não permitiu definir perfeitamente as fases exponencial e estacionária, no entanto, determinou-se uma concentração máxima de biomassa às 52,23 horas de 9,03 g/L, quando se esgotaram os açúcares. A concentração de biomassa no final do ensaio, às 127,27 horas, foi de 12,13 g/L.

A concentração inicial de glucose foi de 16,44 g/L, e a concentração inicial de manose foi de 4,40 g/L. A concentração de ambos os açúcares diminuiu a partir das 24,98 horas, e verificou-se o esgotamento de ambos às 52,23 horas. Os valores disponíveis não permitiram apurar que açúcar se esgotou primeiro, mas no geral, foi evidente que todo o

consumo acompanhou a fase exponencial de crescimento. As taxas de consumo de substrato (r_s) foram estimadas em $0,31 \text{ g}_{\text{glucose}}/(\text{L.h})$, $0,08 \text{ g}_{\text{manose}}/(\text{L.h})$ e $0,40 \text{ g}_{\text{açúcares totais}}/(\text{L.h})$.

O pH inicial foi de 6,92. Este aumentou ligeiramente até 7,05 às 4,18 horas, e partir desse momento diminuiu para 5,77 às 52,23 horas. Finalmente, o pH aumentou até 5,89, mantendo-se assim na gama de valores adequada para o crescimento de *C. necator*.

Às 52,23 horas verificou-se uma concentração de PHA de 2,19 g/L (24,27% mHB/mX). Apenas foi possível determinar um valor de concentração de PHA por GC-FID, no entanto foi verificada acumulação de PHAs em determinados momentos do tempo de incubação por microscopia de fluorescência mediante tratamento com Azul de Nilo. As imagens obtidas permitem ver os grânulos de polímero como pontos brancos brilhantes. Na fase de aceleração do crescimento de biomassa total (28,85 horas) verificaram-se indícios de acumulação ainda que em quantidades reduzidas (Figura 7). A análise da amostra às 120,68 horas revelou uma acumulação significativamente superior na fase estacionária (Figura 8).

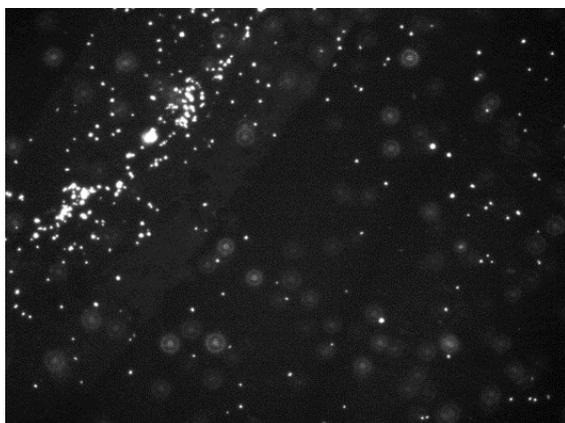


Figura 7: Imagem de microscopia de fluorescência com Azul de Nilo do ensaio de crescimento de *C. necator* em meio MG, às 29,65 horas, com $[X] = 1,37 \text{ g/L}$ (ampliação 100x).

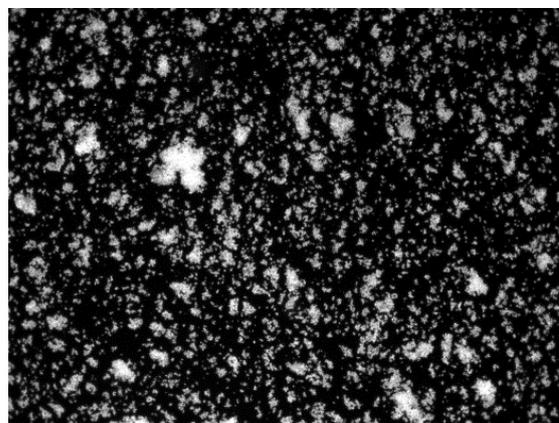


Figura 8: Imagem de microscopia de fluorescência com Azul de Nilo do ensaio de crescimento de *C. necator* em meio MG, às 109,5 horas, com $[X] = 4,14 \text{ g/L}$ (ampliação 100x).

Considerando o momento do ensaio para o qual foi possível quantificar o polímero acumulado (52,23 horas), e em relação à concentração total de açúcares e biomassa nesse instante, foi calculado um rendimento de produto/substrato observado, $(Y_{\text{PHA/S}})_{\text{obs}}$, de 0,22 mPHA/mAçúcar e um rendimento de produto/biomassa observado, $(Y_{\text{PHA/X}})_{\text{obs}}$, de 0,32 mPHA/mX_{res}.

No final do teste procedeu-se à extração do polímero acumulado. O filme obtido (0,0152 g), ilustrado na Figura 9, foi caracterizado por FTIR-ATR, e o espectro resultante apresenta-se na Figura 10.



Figura 9: Filme de PHA obtido da extração do polímero produzido por *C. necator* em meio MG.

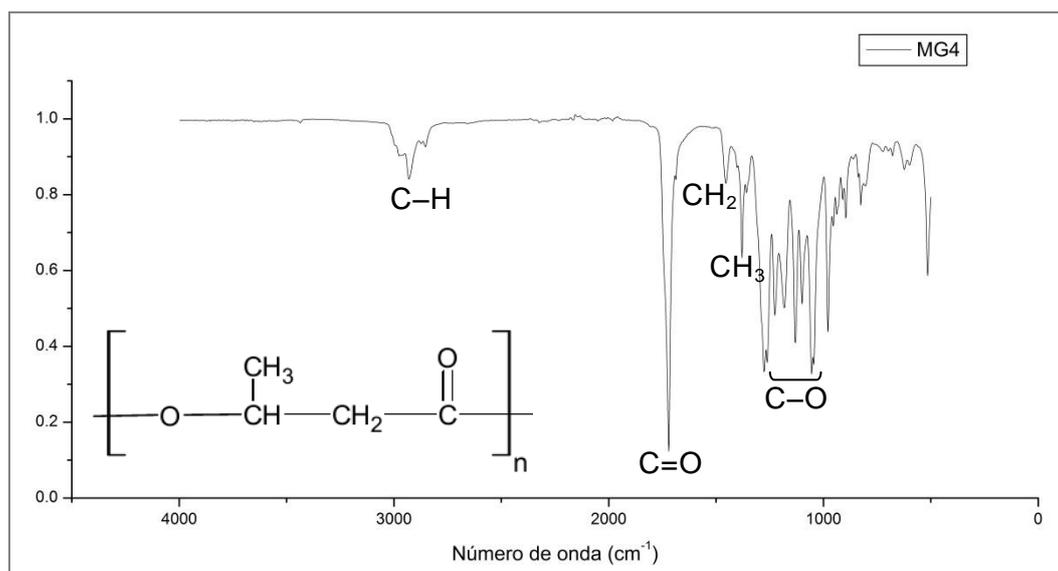


Figura 10: Espectro obtido por FTIR-ATR do filme obtido de *C. necator* mediante crescimento em meio sintético MG (Figura 9), com a indicação das ligações correspondentes aos picos indicados, e estrutura do monómero 3HB.

A série de picos localizados na gama $[1000-1300] \text{ cm}^{-1}$ corresponde ao estiramento da ligação C – O do grupo éster. O pico no comprimento de onda 1344 cm^{-1} é originado pelos grupos terminais OH e pela possível adsorção de água à amostra. O pico ao número de onda 1379 cm^{-1} é característico dos grupos CH_3 , e o pico ao número de onda 1452 cm^{-1} corresponde à deformação assimétrica da ligação C – H nos grupos CH_2 . O pico ao número de onda 1720 cm^{-1} é referente ao estiramento das ligações C=O. O pico na ordem dos

[3000-2850] cm^{-1} corresponde a vibrações de estiramento característica dos alcanos nas ligações C-H.^{134, 135} O espectro obtido apresenta um perfil praticamente semelhante ao descrito por Oliveira *et al.* (2007) relativamente a P(3HB) produzido por *C. necator* a partir de resíduos da produção de soja, e ainda a P(3HB) comercial.¹³⁵

O ensaio realizado confirmou a capacidade de *C. necator* em crescer e produzir P(3HB) a partir da glucose. Além disso, este ensaio mostrou que a manose também pode ser utilizada por esta bactéria demonstrando a potencialidade do EAF poder ser utilizado como substrato para a produção de PHAs.

2.2. ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE PHAS EM MEIO MG E MEIO EAF

O ensaio de produção de PHAs por *C. necator* em meio EAF foi realizado em conjunto com um ensaio em meio sintético MG (21,37 g/L glucose e 5,03 g/L manose), considerando a mesma concentração inicial de biomassa. Os resultados do ensaio em meio sintético MG são apresentados na Figura 11.

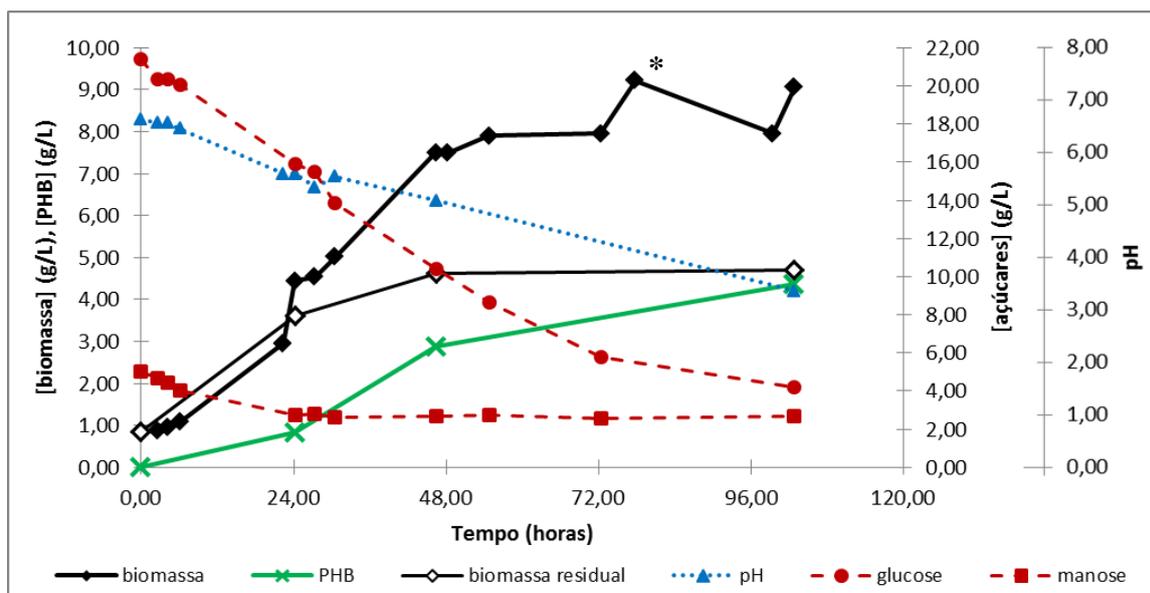


Figura 11: Variação de pH e da concentração de biomassa total e residual, P(3HB), glucose e manose, do ensaio de produção de PHAs por *C. necator* em meio sintético MG.

A concentração inicial de biomassa foi de 0,83 g/L. Após uma fase lag de 2,50 horas, iniciou-se o crescimento exponencial até às 54,75 horas, momento em que se verificou uma concentração de biomassa de 7,90 g/L. A concentração final de biomassa foi de 9,06 g/L, às 102,75 horas. Comparativamente ao ensaio preliminar realizado (Figura 6), o aumento da concentração inicial de biomassa imposto neste ensaio (Figura 11) permitiu diminuir a fase lag (de 11,50 horas para 2,5 horas) e aumentar a concentração final de biomassa obtida (de 7,52 g/L para 9,06 g/L). A taxa específica de crescimento da biomassa total ($\mu_{máxX}$) foi de $0,06 \text{ h}^{-1}$.

Foi sendo monitorizada a acumulação de PHA ao longo do ensaio por microscopia de fluorescência mediante coloração com Azul de Nilo. Às 77,75 horas de incubação, correspondente a uma concentração de biomassa de 9,22 g/L, foi possível confirmar acumulação conforme ilustrado na Figura 12.

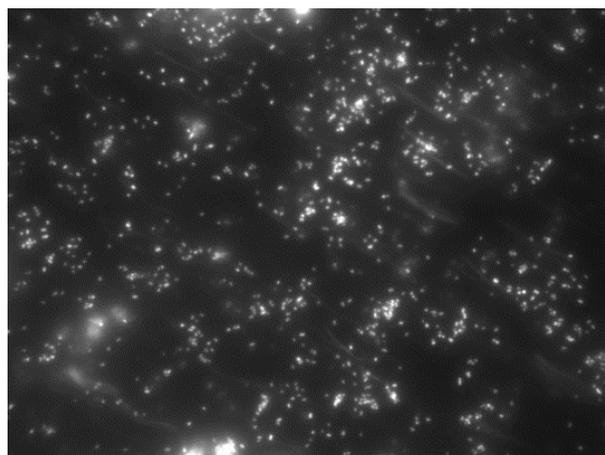


Figura 12: Imagem de microscopia de fluorescência com Azul de Nilo do ensaio de crescimento de *C. necator* em meio MG (Figura 11,*), às 77,75 horas, com $[X_{total}] = 9,22$ g/L (ampliação 1000x).

O polímero foi quantificado e identificado como P(3HB) ao longo do ensaio. Às 24,17 horas a concentração de P(3HB) foi de 0,827 g/L. A concentração de polímero aumentou até 2,87 g/L às 46,42 horas. No final do ensaio, às 102,75 horas, verificou-se o máximo de acumulação de 4,36 g/L (48,16% mPHA/mX). A taxa de produção de PHA (r_p) foi de 0,04 g/(L.h).

A acumulação de PHAs em *C. necator* é considerada não associada ao crescimento, contudo alguns autores defendem que a produção pode acompanhar o crescimento em determinada extensão, mesmo em meios aparentemente equilibrados.^{136, 137} Essa ideia pode derivar do facto de a concentração de biomassa estar relacionada com a quantidade de PHA produzida, uma vez que o polímero é acumulado intracelularmente. Para relacionar a produção de PHAs com o crescimento microbiano é útil analisar a concentração de PHAs em relação à concentração de biomassa residual, X_{res} (concentração de biomassa medida menos a concentração de PHA apurada).

A concentração de biomassa residual aumentou até 10,41 g/L às 46,42 horas, e posteriormente estabilizou em fase estacionária até ao final do ensaio. Apesar de se ter observado a acumulação de PHA na fase exponencial de aumento da biomassa residual verificou-se que, de facto, a maior parte da acumulação do polímero ocorreu a partir da desaceleração do crescimento e durante a fase estacionária. A taxa específica de crescimento máxima da biomassa residual ($\mu_{máxX_{res}}$) foi de $0,06 \text{ h}^{-1}$, igual à calculada para a biomassa total.

A concentração inicial de glucose foi de 21,37 g/L, e a concentração inicial de manose foi de 5,03 g/L. A concentração de glucose diminuiu constantemente até às 72,33 horas para um valor de 5,75 g/L, e ainda até ao final do ensaio, porém nunca se esgotando e apresentando um valor final de 4,22 g/L. A concentração de manose sofreu um decréscimo acentuado durante a fase exponencial de crescimento de biomassa residual, apresentando um valor de 2,63 g/L às 30,50 horas, que posteriormente se manteve até ao fim do ensaio. As taxas de consumo do substrato (r_s) foram estimadas em 0,17 $\text{g}_{\text{glucose}}/(\text{L.h})$, 0,02 $\text{g}_{\text{manose}}/(\text{L.h})$ e 0,19 $\text{g}_{\text{açúcares totais}}/(\text{L.h})$.

Considerando todo o tempo do ensaio, e os açúcares e biomassa totais, verificou-se um rendimento de produto/substrato observado, $(Y_{\text{PHA/S}})_{\text{obs}}$, de 0,22 mPHA/mAçúcar e um rendimento de produto/biomassa observado, $(Y_{\text{PHA/X}})_{\text{obs}}$, de 0,93 mPHA/m X_{res} .

O pH inicial foi 6,64 e diminuiu ao longo de todo o tempo de incubação. No final da fase lag (4,35 horas) o pH tem o valor de 6,56. Por volta das 72 horas o pH desceu para valores considerados inibitórios ($\text{pH} < 5,5$). O pH final foi de 3,36, um valor muito baixo para os requisitos da cultura. O registo de valores baixos de pH aliado facto de não se verificar depleção total de açúcares sugere inibição por pH.

Os resultados do ensaio em meio EAF são apresentados na Figura 13.

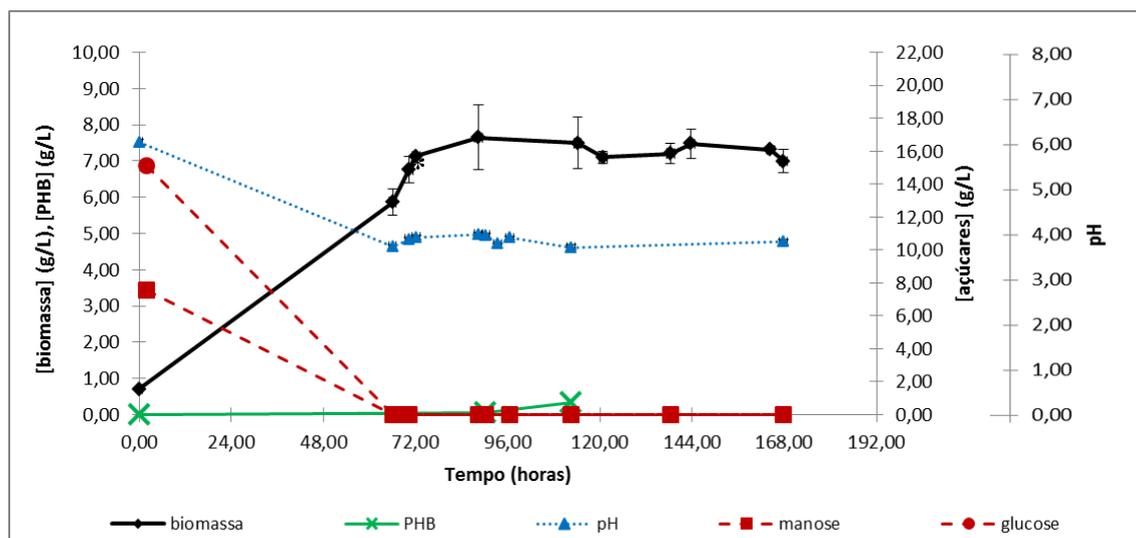


Figura 13: Variação de pH e da concentração de biomassa, P(3HB), glucose e manose, durante o ensaio de produção de PHAs por *C. necator* em meio EAF. Desvio padrão assinalado relativo à média da concentração de biomassa de amostras biológicas (ensaio em duplicado).

A concentração inicial de biomassa foi de 0,70 g/L. A amostragem não permitiu definir as fases lag e exponencial. Das 66,00 às 72,08 horas verificou-se crescimento que pode ainda associar-se ao comportamento da cultura na fase exponencial, com um aumento de concentração de 5,86 g/L às 66,00 horas para 7,12 g/L às 72,08 horas. O crescimento entrou aí em fase estacionária, até ao final da incubação às 167,99 horas, quando apresentou uma concentração final de 6,99 g/L. A taxa específica de crescimento da biomassa total ($\mu_{\text{máx}}$) foi de $0,03 \text{ h}^{-1}$.

Foi verificada a acumulação de PHA por microscopia de fluorescência mediante coloração com Azul de Nilo. Às 70,25 horas de incubação, correspondente a uma concentração de biomassa de 7,11 g/L, foi possível confirmar acumulação conforme ilustrado na Figura 14. Não foi possível quantificar a acumulação de PHAs ao longo da totalidade do ensaio. Verificou-se uma concentração de polímero no valor de 0,34 g/L às 112,42 horas, identificado como P(3HB) (3,63% mPHA/mX). Considerando os valores obtidos, a taxa de produção de PHA (r_p) foi de $0,003 \text{ g/(L.h)}$.

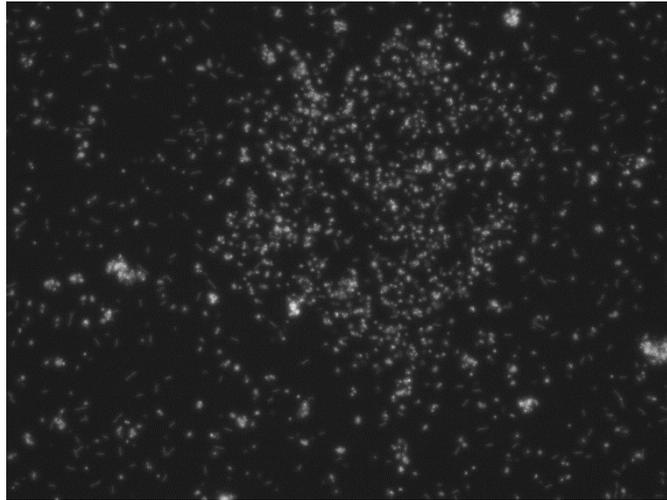


Figura 14: Imagem de microscopia de fluorescência com Azul de Nilo do ensaio de crescimento de *C. necator* em meio EAF (Figura 13,*), às 70,25 horas, com $[X_{total}] = 7,11$ g/L (ampliação 400x).

A concentração inicial de glucose foi de 15,09 g/L, e a concentração inicial de manose foi de 3,43 g/L. Os valores disponíveis não permitiram acompanhar o consumo de substrato ou apurar que açúcar se esgotou primeiro, mas no geral, é evidente que todo o consumo acompanhou a fase exponencial de crescimento. Verificou-se o esgotamento de ambos os açúcares às 66,00 horas. As taxas de consumo do substrato (r_s) foram estimadas em 0,22 g_{glucose}/(L.h), 0,05 g_{manose}/(L.h) e 0,27 g_{açúcares totais}/(L.h).

Considerando o período até às 112,42 e o valor de açúcares e biomassa totais nesse momento, verificou-se um rendimento de produto/substrato observado, $(Y_{PHA/S})_{obs}$, de 0,02 mPHA/mAçúcar e um rendimento de produto/biomassa observado, $(Y_{PHA/X})_{obs}$, de 0,04 mPHA/mX_{res}.

O pH inicial foi de 6,02. Durante o período correspondente ao crescimento exponencial o pH diminuiu para 3,71, às 66,00 horas, valor considerado inibitório. Até ao final do tempo de incubação o pH sofreu apenas ligeiras variações, apresentando um valor final de 3,81 às 167,75 horas. Estes valores de pH tão baixos podem ser responsáveis pela baixa acumulação de PHA neste ensaio.

A Tabela 14 contém alguns parâmetros considerados na análise comparativa dos ensaios e inclui os resultados de Khanna *et al.* (2005) que investigaram o crescimento e produção de PHAs de *C. necator* a partir de diferentes fontes de carbono em meio sintético, entre as quais glucose (20 g/L).¹³⁸

Tabela 14: Parâmetros relativos ao ensaio em meio MG (Figura 11) e ao ensaio em meio EAF (Figura 13).

Referência	Presente trabalho		Khanna <i>et al.</i> (2005) ¹³⁸
	Sintético MG	EAF	Sintético
Meio			
$[X_{\text{inicial}}]$ (g/L)	0,87	0,70	n.d.
$[X_{\text{final}}]$ (g/L)	9,06 (102,75 h)	6,99 (167,99 h)	2,33
$[\text{açúcares totais}]_{\text{inicial}}$ (g/L)	26,40	18,52	20 (glucose)
Consumo de açúcares	Parcial	Total	n.d.
r_s açúcares totais (g/(L.h))	0,02	0,05	n.d.
$[P(3HB)]$ (g/L)	4,36 (102,75 h)	0,34 (112,42 h)	0,03
% P(3HB) (mPHA/mX)	48,16 (102,75 h)	3,63 (112,42 h)	n.d.
pH_{final}	3,36	3,81	n.d.

n.d. – não definido

O ensaio em meio EAF (Figura 13) resultou em concentrações de biomassa e P(3HB) inferiores às obtidas no ensaio controlo em meio MG (Figura 11), apesar de no ensaio em meio EAF a concentração inicial de biomassa ser semelhante. Isto pode dever-se ao facto de a concentração inicial de açúcares no meio MG ser superior. No ensaio realizado em meio EAF, verificou-se uma taxa de consumo de açúcares (r_s) superior, e a depleção total de manose e glucose. No ensaio em meio MG verificaram-se valores superiores quer de concentração quer de percentagem de P(3HB). Em relação ao ensaio em meio sintético com 20 g/L glucose realizado por Khanna *et al.* (2005),¹³⁸ ambos os ensaios realizados neste trabalho revelaram melhores resultados, tanto a nível de concentração de biomassa final quanto em relação à concentração de P(3HB) acumulado.

Ambos os ensaios realizados neste trabalho apresentaram valores muito baixos de pH. No entanto, no ensaio em meio MG apenas se verificou valores de pH inferiores a 5,5 por volta das 72 horas (a meio da fase estacionária de crescimento), enquanto no ensaio em meio EAF o pH foi inferior a 5,5 durante a fase de crescimento exponencial. Uma vez que o pH atingiu valores considerados inibitórios em ambos os ensaios, os resultados pobres do ensaio em meio EAF poderão derivar também de possíveis condições adversas impostas pelo próprio EAF.

Foi então realizado outro ensaio em meio EAF, com uma maior concentração inicial de biomassa, de modo a averiguar se uma fração superior de inóculo permitiria a obtenção de melhores resultados.

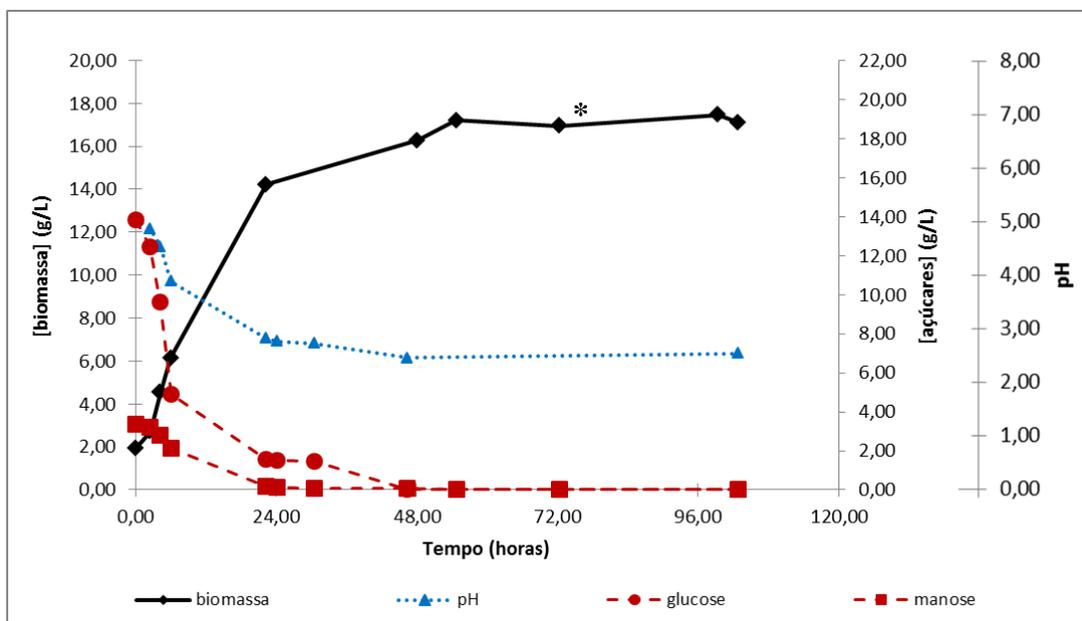


Figura 15: Variação de pH e da concentração de biomassa, glucose e manose durante o ensaio de produção de PHAs por *C. necator* em meio EAF.

A concentração inicial de biomassa foi de 1,91 g/L. A fase lag de crescimento foi indetetável. Verificou-se um aumento exponencial da concentração da biomassa total até uma fase de desaceleração às 22,33 horas, aquando de registou uma concentração de 14,21 g/L. A concentração final de biomassa foi de 17,11 g/L.

Não foi possível quantificar a acumulação de PHA por GC-FID. Foi verificada a acumulação de PHA por microscopia de fluorescência mediante coloração com Azul de Nilo. Às 77,75 horas de incubação, correspondente a uma concentração de biomassa de 18,62 g/L, foi possível confirmar acumulação conforme ilustrado na Figura 16.

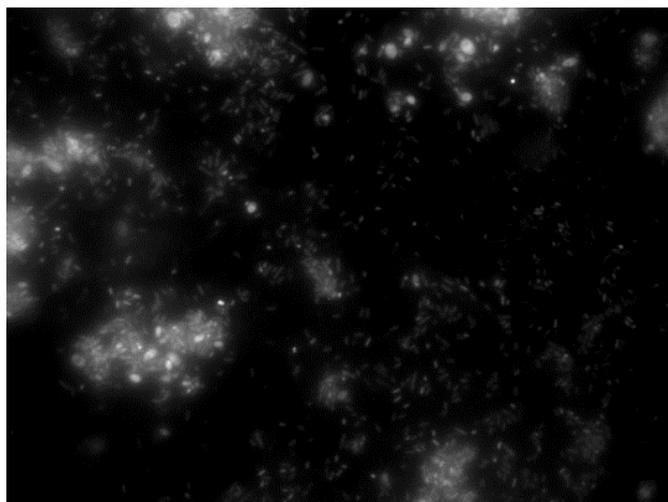


Figura 16: Imagem de microscopia de fluorescência com Azul de Nilo do ensaio de crescimento de *C. necator* em meio EAF (Figura 15,*), às 77,75 horas, com $[X_{\text{total}}]=18,62$ g/L (ampliação 1000x).

Foi extraído o polímero do ensaio de *C. necator* em meio EAF, a partir do ensaio representado na Figura 15. O filme obtido (0,0127 g), ilustrado na Figura 17, foi analisado por FTIR-ATR, e o respetivo espectro é apresentado na Figura 18. O peso do filme permitiu estimar um rendimento de $\% \text{PHA}_{\text{ext}}$ de 30,38% mPHA/mX.



Figura 17: Filme de PHA obtido da extração do polímero produzido por *C. necator* em meio EAF.

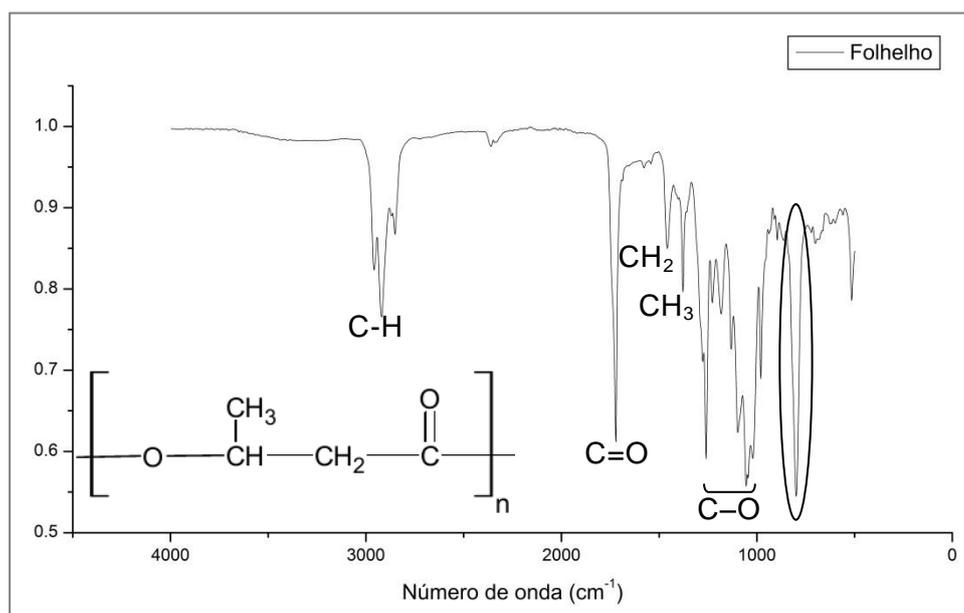


Figura 18: Espectro de FTIR-ATR do filme de PHA produzido por *C. necator* em meio EAF (Figura 17), com a indicação das ligações correspondentes aos picos indicados, e estrutura do monómero 3HB.

O espectro de FTIR-ATR do filme obtido da produção em EAF exibiu o perfil característico para P(3HB) semelhante ao obtido inicialmente no ensaio com meio sintético MG. De igual modo, apresenta a série de picos na gama $[1000-1300] \text{ cm}^{-1}$ corresponde ao estiramento da ligação C – O do grupo éster, o pico aos 1379 cm^{-1} característico dos grupos CH_3 , o pico aos 1452 cm^{-1} correspondente à deformação assimétrica da ligação C – H nos grupos CH_2 , o pico aos 1720 cm^{-1} referente ao estiramento das ligações $\text{C}=\text{O}$ associadas ao grupo éster e o pico na ordem dos $[3000-2850] \text{ cm}^{-1}$ correspondente a vibrações de estiramento característica dos alcanos nas ligações C – H.^{134, 135} Este espectro relativo ao filme obtido do ensaio em EAF difere do espectro referente ao filme obtido do ensaio em meio sintético MG, principalmente ao apresentar um pico intenso por volta do comprimento de onda de 800 cm^{-1} . Este pico encontra-se na gama tabelada para as ligações C – H angulares fora de plano.¹³⁴ O facto de este pico apenas estar presente no espectro de FTIR-ATR do filme produzido em EAF, aliado ao método simples de extração usado, sugere que o pico seja originado por resíduos do meio presentes no filme. Para esclarecer essa hipótese, poderia identificar-se a origem do pico por técnicas complementares ou poderia simplesmente proceder-se à lavagem do filme, *e. g.* mediante dissolução em clorofórmio e precipitação promovida por metanol ou etanol,⁵² e realizar uma nova análise FTIR-ATR. Outras disparidades verificadas, como uma diferença na gama correspondente ao estiramento da ligação C – O, ou diferenças relativas à largura ou intensidade de alguns

picos (que podem derivar de diferenças no grau de cristalinidade), não comprometem a identificação do polímero como sendo P(3HB), mas tornam necessário complementar a análise por FTIR-ATR com outras metodologias de caracterização estrutural.

A concentração inicial de glucose foi de 13,84 g/L, e a concentração inicial de manose foi de 3,34 g/L. A diferença entre estes valores e a concentração conhecida de glucose e manose no EAF deve-se à diluição realizada na inoculação. A concentração de glucose diminuiu acentuadamente nas primeiras 6,08 horas até um valor de 4,90 g/L, e toda a glucose foi consumida até às 46,42 horas. A manose foi maioritariamente consumida nas primeiras 22,33 horas. As taxas de consumo do substrato (r_s) foram estimadas considerando as primeiras 46,42 horas do ensaio, apresentando os valores de 0,30 $\text{g}_{\text{glucose}}/(\text{L.h})$, 0,07 $\text{g}_{\text{manose}}/(\text{L.h})$ e 0,37 $\text{g}_{\text{açúcares totais}}/(\text{L.h})$.

O pH inicial foi de 5,06, já inferior ao valor considerado inibitório ($\text{pH} < 5,5$). O pH decresceu durante o período correspondente ao crescimento celular exponencial, sendo que na fase de desaceleração do crescimento de biomassa, às 22,33 horas, o pH apresentou o valor de 2,82. Até ao final do período de incubação, durante a fase estacionária de crescimento de biomassa, os valores de pH não variaram muito. No final do tempo de incubação, às 102,75 horas, o valor de pH foi 2,54.

No geral, os resultados dos ensaios realizados em EAF indicam inibição por pH. A literatura sugere que o decréscimo de pH pode derivar do consumo de amónia (NH_4^+), introduzida no meio sob a forma de cloreto de amónia e citrato de amónia.^{139, 140} Pressupondo isso, a variação de pH poderá refletir um consumo acentuado de azoto que desloque o rácio C:N no sentido de limitação de azoto. A quantificação de amónia ao longo do tempo do ensaio seria necessária para a confirmação desta hipótese. A introdução de hidróxido de amónia no meio permitiria regular o pH e manter condições indicadas para o crescimento microbiano. No entanto, a regulação do pH sem introdução de amónia no meio, recorrendo por exemplo a hidróxido de sódio (NaOH), deverá permitir manter a suposta limitação de azoto e contrariar a inibição que advém da acidificação do meio.¹⁴¹

É apresentado na Tabela 15 um resumo comparativo dos valores resultados obtidos nos ensaios em EAF. O 2º ensaio, com 1,91 g/L de biomassa inicial, apresentou valores superiores de concentração final de biomassa (17,11 g/L), %P(3HB) como %PHAext (30,38%), taxa específica de crescimento ($0,19 \text{ h}^{-1}$) e taxa de consumo de substrato (0,37

$\mu_{\text{açúcares totais/L}}$). É evidente que o aumento da concentração inicial de biomassa (de 0,70 g/L para 1,91 g/L) permitiu obter melhores resultados.

Tabela 15: Parâmetros relativos aos ensaios em meio EAF (Figura 13, 1º ensaio; Figura 15, 2º ensaio).

Meio	EAF (1º ensaio)	EAF (2º ensaio)
$[\text{açúcares totais}]_{\text{inicial}} \text{ (g/L)}$	18,52 (GLC+MAN)	17,18 (GLC+MAN)
$[\text{X}]_{\text{inicial}} \text{ (g/L)}$	0,70	1,91
$[\text{X}]_{\text{final}} \text{ (g/L)}$	6,99	17,11
$\mu_{\text{máxX}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0,03	0,19
$\mu_{\text{máxXres}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	n. d.	n. d.
$r_s \text{ glucose (g/(L.h))}$	0,22	0,30
$r_s \text{ manose (g/(L.h))}$	0,05	0,07
$r_s \text{ Açúcares Totais (g/(L.h))}$	0,27	0,37
$r_p \text{ (g/(L.h))}$	0,003	n. d.
$[\text{P(3HB)}] \text{ (g/L)}$	0,34 (112,42 h)	n. d.
$\% \text{ P(3HB) (m PHA/mX)}$	3,63	30,38 (filme)
$(Y_{\text{P/S}})_{\text{obs}} \text{ (mPHA/mS)}$	0,02	n. d.
$(Y_{\text{P/X}})_{\text{obs}} \text{ (mPHA/mX}_{\text{res}}\text{)}$	0,04	n. d.

n. d. – não definido

2.3. ENSAIO EM REATOR

Foi realizado um ensaio de produção de PHAs por *C. necator* em reator, conforme a Figura 19, com a obtenção dos resultados apresentados na Figura 20.



Figura 19: Fotografia do reator e respetivos controladores de pH, oxigénio, temperatura e arejamento.

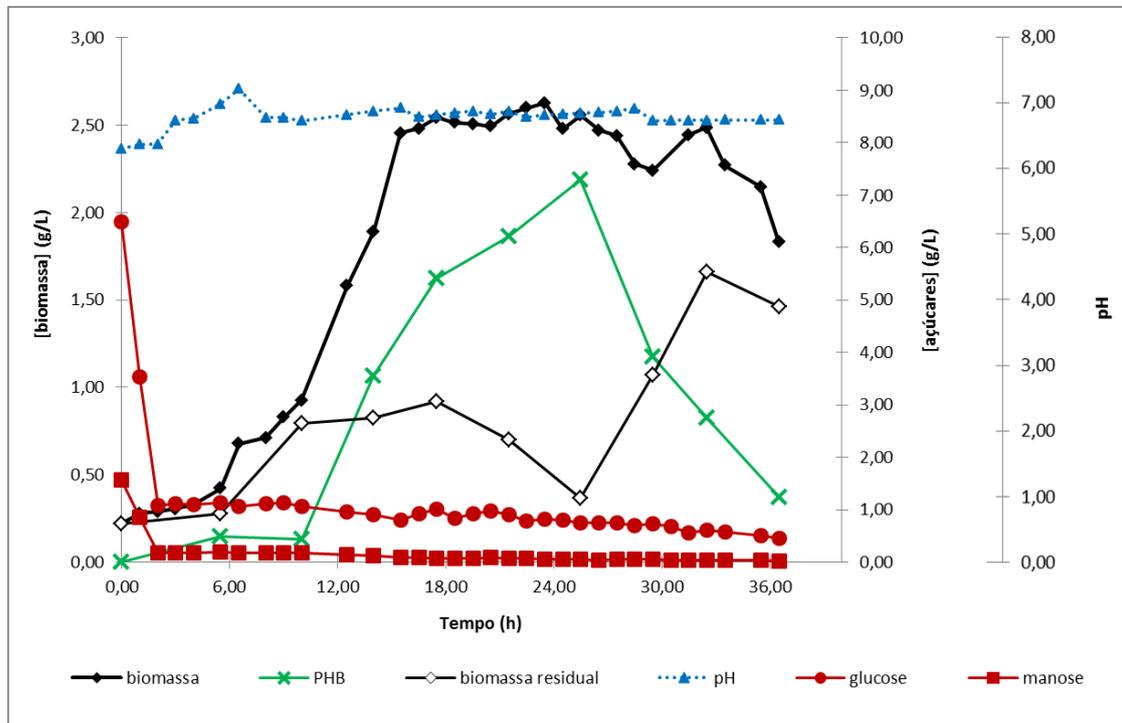


Figura 20: Variação de pH e concentração de biomassa, P(3HB), glucose e manose durante o ensaio de produção de PHAs por *C. necator* em meio 50% (v/v) EAF, em reator.

Para o ensaio em reator foi usado EAF diluído (50% v/v), devido à indisponibilidade do resíduo. Assim, a concentração inicial de glucose foi de 6,50 g/L, e a concentração inicial de manose foi de 1,56 g/L. Ambos os açúcares foram consumidos rapidamente nas primeiras duas horas, não se esgotando e diminuindo apenas ligeiramente até ao final do ensaio. Às 36,50 horas, a concentração final apurada de glucose foi de 0,45 g/L e de manose foi de 0,02 g/L. As taxas de consumo do substrato (r_s) foram determinadas para as primeiras duas horas em 2,71 $\text{g}_{\text{glucose}}/(\text{L.h})$, 0,69 $\text{g}_{\text{manose}}/(\text{L.h})$ e 3,40 $\text{g}_{\text{açúcares totais}}/(\text{L.h})$. O perfil de consumo de açúcares sugere que outros compostos no EAF tenham sido utilizados para o crescimento e a produção de PHAs, como oligossacarídeos e taninos presentes no resíduo em menores quantidades, mas passíveis de serem utilizados por *C. necator*.

A concentração inicial de biomassa foi de 0,22 g/L. Após uma fase lag de 4,00 horas, a concentração de biomassa total aumentou, verificando-se um valor de 2,46 g/L às 15,50 horas. Posteriormente, a concentração de biomassa total estabilizou e no final do ensaio foi registada uma diminuição até ao valor final de concentração de biomassa total registado de 1,83 g/L, às 36,50 horas. A taxa específica de crescimento da biomassa total ($\mu_{\text{máxX}}$) foi de 0,18 h^{-1} .

O PHA acumulado foi quantificado e identificado como P(3HB). Às 5,50 horas foi verificada uma acumulação de 0,15 g/L, e até às 10 horas concentração diminuiu ligeiramente para 0,13 g/L. Posteriormente deu-se um aumento de concentração até ao máximo de acumulação verificado, 2,19 g/L (85,60 % mPHA/mX) às 25,50 horas. Até ao final do ensaio, a concentração de P(3HB) diminuiu, registando-se um valor final de 0,37 às 36,50 horas. A taxa de produção de PHA (r_p) foi de 0,03 $\text{g}/(\text{L.h})$.

Da determinação da biomassa residual verificou-se uma fase lag de crescimento de 5,50 horas. O crescimento deu-se até 0,79 g/L às 10 horas. Após uma fase estacionária de 7,50 horas, a concentração de biomassa residual diminuiu acompanhando o aumento de concentração de polímero. Posteriormente, a concentração de biomassa residual aumenta com a diminuição de polímero, sugerindo que se deu consumo de P(3HB) para proveito celular. A taxa específica de crescimento máxima da biomassa residual ($\mu_{\text{máxXres}}$) foi de 0,24 h^{-1} .

O pH inicial foi 6,31. O pH aumentou até às 6,50 horas, para um valor de 7,22. Mediante regularização com NaOH, os valores de pH mantiveram-se na gama [6,73-6,93]

até às 40 horas, sendo que o pH final foi de 6,73. A regulação do pH que se verificara necessária nos ensaios em “Erlenmeyer” conseguiu contrariar a inibição associada à acidificação do meio ao longo do tempo de incubação.

O oxigénio dissolvido (OD) foi mantido entre 20% a 30% de saturação com o ajustamento da taxa de arejamento. No geral, a elevada necessidade de arejamento da cultura obrigou a fornecer uma taxa de arejamento muito elevada, de modo a manter as condições aeróbicas necessárias ao crescimento e produção. Para além de poder impor condições agressivas para as células, a elevada taxa de arejamento necessária pode encarecer o processo de produção de PHAs neste contexto.

Na Tabela 16 encontra-se um resumo de parâmetros considerados na análise comparativa dos ensaios de *C. necator* em meio EAF (“Erlenmeyer” e reator), e resultados pertinentes da literatura, para a comparação de produção de PHA em relação a outro resíduo agroindustrial rico em açúcares.

Tabela 16: Resumo de parâmetros considerados na análise comparativa dos ensaios de *C. necator* em meio EAF, e valores da literatura.

Referência	Presente trabalho		Zahari <i>et al.</i> (2012) ¹⁴²	
	EAF (2º ensaio)	EAF 50% (v/v) Reator	Sumo de pecíolos residuais da produção de óleo de palma	
Meio			20% SP (v/v)	30% SP (v/v)
[açúcares totais] _{inicial} (g/L)	17,18 ^a	8,06 ^a	10,42 ^b	15,72 ^b
[X] _{inicial} (g/L)	1,91	0,22	n. d.	n. d.
[X] _{final} (g/L)	17,11	1,83	4,80	8,42
$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	0,19	0,18	n. d.	n. d.
$\mu_{\text{máxRes}}$ (h ⁻¹)	n. d.	0,23	n. d.	n. d.
r_s glucose (g/(L.h))	0,30	2,71	n. d.	n. d.
r_s manose (g/(L.h))	0,07	0,69	n. d.	n. d.
r_s Açúcares Totais (g/(L.h))	0,37	3,40	n. d.	n. d.
r_p (g/(L.h))	n. d.	0,03	n. d.	n. d.
[P(3HB)] (g/L)	n. d.	2,19 (máx)	1,06	2,67
% P(3HB) (m PHA/mX)	30,38 (filme)	85,60	22	32
$(Y_{P/S})_{\text{obs}}$ (m PHA/m S)	n. d.	0,09	0,12	0,20

n. d. – não definido; a – glucose e manose; b – glucose, sacarose e frutose.

O ensaio em reator apresentou alguns resultados semelhantes ao 2º ensaio realizado em meio EAF, designadamente a taxa específica de crescimento máxima (0,19 h⁻¹ no ensaio em “Erlenmeyer” e 0,18 h⁻¹ no ensaio em reator) e o rendimento produto/substrato observado (0,30 no ensaio em “Erlenmeyer” e 0,27 no ensaio em reator). No entanto, o ensaio em reator apresentou o melhor resultado de produção neste trabalho, com 85,60% P(3HB) (m PHA/mX). Zahari *et al.* (2005) estudaram a produção de P(3HB) por *C. necator* a partir de sumo dos pecíolos (SP) da rama originária da poda de palma, um abundante subproduto agroindustrial da produção de óleo de palma.¹⁴² O sumo, obtido por prensagem dos pecíolos e posterior centrifugação e filtração, é rico em glucose (70,9%), sacarose (26,89%) e frutose (2,21%). Os resultados obtidos pelos autores nos ensaios em descontínuo são apresentados na Tabela 16. O 2º ensaio em meio EAF produziu uma

%P(3HB) semelhante ao ensaio em 30% SP, (30,38% P(3HB) e 32% P(3HB), respetivamente), no entanto atingiu valores muito superiores de concentração de biomassa (17,12 g/L no ensaio em meio EAF, comparativamente a 8,42 g/L no ensaio em 30% SP), a partir de uma concentração inicial de açúcares apenas ligeiramente superior. A partir de concentrações iniciais de açúcares semelhantes, o ensaio realizado em reator com 50% (v/v) EAF não atingiu uma concentração de biomassa tão elevada quanto o ensaio em 20% SP (1,83 g/L no ensaio em meio EAF, comparativamente a 4,80 g/L no ensaio em 20% SP), no entanto no ensaio em reator com EAF foram obtidos melhores resultados de acumulação, nomeadamente o dobro da concentração de P(3HB), e quase o triplo de %P(3HB).

3. ENSAIOS COM *H. MEDITERRANEI*

3.1. CRESCIMENTO EM MEIO DSMZ372

H. mediterranei foi inicialmente cultivada em meio DSMZ372. Este é o meio indicado pelo banco de culturas para esta estirpe de *H. mediterranei* e foi o meio usado para reavivar a cultura, e para realizar o primeiro pré-inóculo em todos os ensaios.

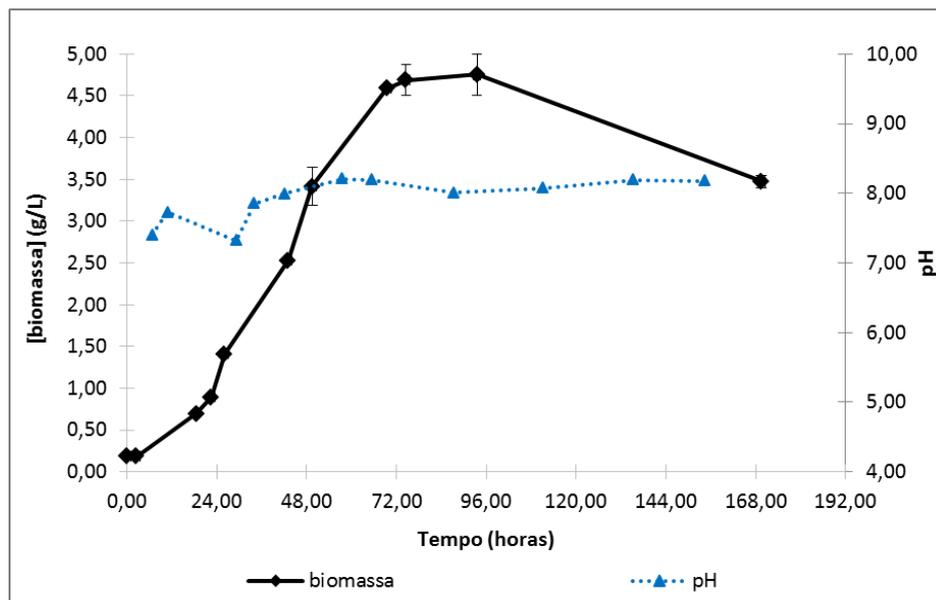


Figura 21: Variação de pH e da concentração de biomassa durante o ensaio de crescimento de *H. mediterranei* em meio DSMZ372. Desvio padrão assinalado relativo à média calculada da concentração de biomassa de amostras biológicas (ensaio em duplicado).

Este ensaio ilustra o crescimento de *H. mediterranei* em meio ótimo sem glucose. A concentração inicial de biomassa foi de 0,19 g/L. A concentração de biomassa aumentou exponencialmente até às 74,50 horas, fase de desaceleração, onde se verificou uma concentração celular de 4,69 g/L. Até ao final de crescimento a cultura manteve-se em fase estacionária, seguida de uma fase de morte, apresentando assim uma concentração de biomassa final de 3,47 g/L às 169,50 horas. A taxa específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) foi de $0,05 \text{ h}^{-1}$. O primeiro valor de pH, 7,4, foi obtido às 6,68 horas, ainda durante a fase lag de crescimento. O pH então aumentou para 7,73 às 10,83 horas, diminuiu para 7,32 às 29,13 horas e voltou a aumentar até 8,21 às 57,50 horas, estabilizando. O pH manteve-se na gama [8,01-8,19] até ao final da monitorização, às 154,50 horas, apresentando aí o valor de 8,18.

3.2. ENSAIOS EM MEIO SINTÉTICO COM GLUCOSE

Para estudar o crescimento de *H. mediterranei* e associada acumulação de PHAs recorrendo a glucose foi utilizado o meio definido por Fang *et al.*, 2010 (meio Fang2010).¹³¹

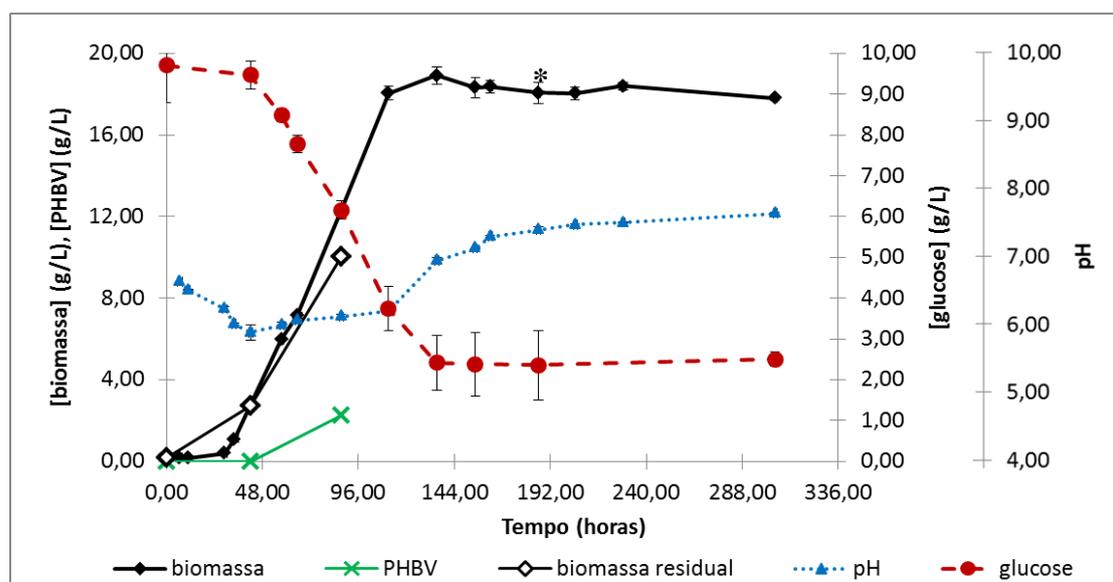


Figura 22: Variação de pH e da concentração de biomassa, P(3HB/3HV) e glucose durante o ensaio de produção de PHAs por *H. mediterranei* em meio Fang2010 com 1% de glucose. Desvio padrão assinalado relativo à média calculada da concentração de biomassa de amostras biológicas (ensaio em duplicado).

A concentração inicial de biomassa foi de 0,17 g/L. Após uma fase lag de 29,13 horas, a concentração de biomassa total aumentou exponencialmente até 18,04 g/L às 111,00 horas, início da fase de desaceleração. A concentração de biomassa total diminuiu então de 18,92 g/L às 135,25 horas para uma concentração final de biomassa total de 17,81 g/L no final da incubação, às 304,50 horas. Considerando a variação de biomassa total em crescimento exponencial, entre as 29,13 às 111,00 horas, verificou-se uma taxa específica de crescimento máxima da biomassa total ($\mu_{\text{máx}}$) de 0,06 h⁻¹.

Não se verificou acumulação de PHAs até às 42,00 horas, ou seja, até ao início do crescimento de biomassa. Às 87,25 horas verificou-se uma concentração de PHA de 2,26 g/L (18,39% mPHA/mX), identificado como P(3HB/3HV) (89,78% HB/10,22% HV). Não foi possível quantificar a acumulação por GC-FID no restante período do ensaio. Foi no entanto possível constatar a acumulação de PHAs por microscopia de fluorescência

mediante coloração com Azul de Nilo, às 186 horas para uma concentração de biomassa de 18,86 g/L, conforme a Figura 23.

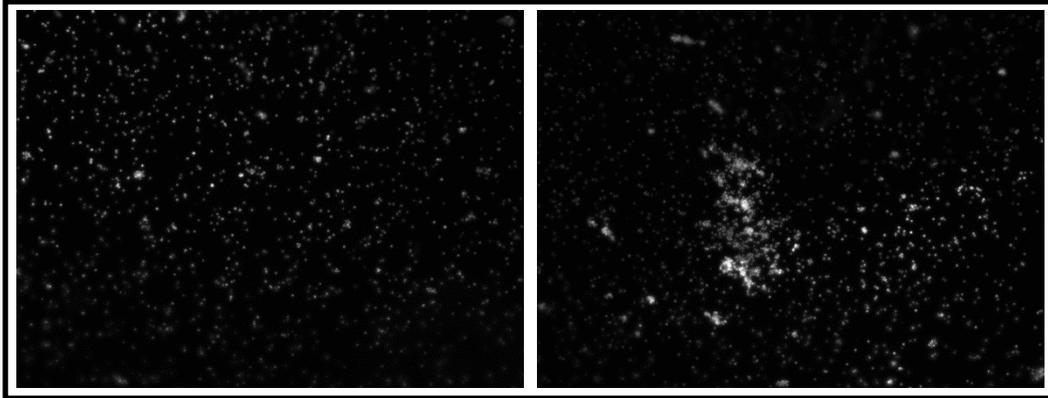


Figura 23: Imagens de microscopia de fluorescência com Azul de Nilo do ensaio de crescimento de *H. mediterranei* em meio Fang 1% de glucose (Figura 22), às 186 horas, com [biomassa]=18,86 g/L (ampliação 400x).

A concentração inicial de glucose foi de 9,71 g/L, não se verificando variação desse valor durante fase lag de crescimento de biomassa. O consumo de glucose acompanhou o crescimento exponencial de biomassa, diminuindo de 9,47 g/L às 42,00 horas para 2,41 g/L às 135,45 horas. Posteriormente não se verificou alteração da concentração de glucose no meio até ao final da fase estacionária de crescimento, às 304,50 horas, quando se registou uma concentração final de glucose de 2,50 g/L. Considerando o consumo acentuado de glucose nas primeiras 135,25 horas, foi apurada uma taxa de consumo de substrato (r_s) de 0,05 g_{glucose}/(L.h).

Considerando a quantificação de PHA às 87,25 horas, e a respetiva concentração de glucose e biomassa total, verificou-se um rendimento de produto/substrato observado, $(Y_{PHA/S})_{obs}$, de 0,64 mPHA/mAçúcar e um rendimento de produto/biomassa observado, $(Y_{PHA/X})_{obs}$, de 0,23 mPHA/mX_{res}.

O pH inicial foi de 6,64. O valor de pH diminuiu para 6,02 durante o período correspondente à fase lag de crescimento de biomassa. No período correspondente ao crescimento exponencial da biomassa, o pH manteve-se na gama [6,00-6,22]. No início da fase estacionária de crescimento de biomassa, o pH então aumentou gradualmente até 7,40 às 186,00 horas, a partir do qual estabilizou com uma ligeira variação incremental até 7,65 no final do período do ensaio. Estes valores estão próximos dos valores indicados para o cultivo de *H. mediterranei*.

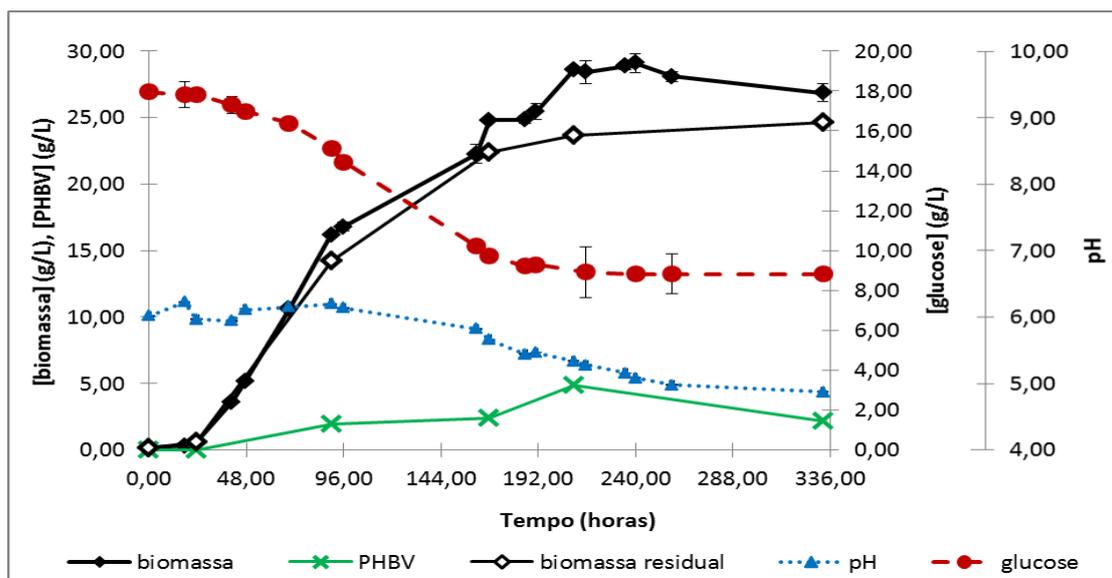


Figura 24: Variação de pH e da concentração de biomassa, P(3HB/3HV) e glucose durante o ensaio de produção de PHAs por *H. mediterranei* em meio Fang2010 com 2% de glucose. Desvio padrão assinalado relativo à média calculada da concentração de biomassa de amostras biológicas (ensaio em duplicado).

No ensaio em 2% glucose, a concentração inicial de biomassa foi de 0,19 g/L (semelhante à concentração inicial do ensaio em 1% de glucose, 0,17 g/L, Figura 22). A fase lag durou aproximadamente 23,50 horas (menos 5,67 horas que a fase lag verificada no ensaio com 1% glucose). A concentração de biomassa total aumentou de 0,58 g/L às 23,50 horas até 28,57 g/L às 209,50 horas, desacelerando e estabilizando até ao final do ensaio. A concentração de biomassa total final foi de 26,84 às 332,50 horas.

Acumulação de PHAs foi inicialmente registada às 90,00 horas, com 1,98 g/L de P(3HB/3HV). A produção de PHA acompanha o crescimento de biomassa, atingindo um valor máximo de 4,89 g/L (17,21% mPHA/mX) às 209,50 horas. A concentração de PHA diminuiu até ao final do ensaio, até 2,18 g/L às 332,50 horas. A composição do copolímero foi consistente ao longo do tempo como 90% HB/ 10% HV, em média. A taxa de produção de PHA (r_p) foi de 0,03 g/(L.h).

Tendo sido monitorizada a acumulação de PHA ao longo do ensaio, foi possível definir a curva de crescimento relativa à biomassa residual, permitindo distinguir a variação de biomassa e produção de polímero. Assim, verificou-se que a fase de crescimento exponencial de biomassa residual terminou às 168,00 horas, com um valor de 22,36 g/L, mantendo-se em fase estacionária até ao final do ensaio, apresentando uma

concentração final de biomassa residual de 24,67 g/L. A taxa específica de crescimento da biomassa residual ($\mu_{\text{máx}X_{\text{res}}}$) foi de 0,03 h⁻¹.

A concentração inicial de glucose apurada foi de 17,96 g/L. (Não se verificou a concentração relativa aos 2% glucose pretendidos, devido à diluição inadvertida efetuada na inoculação). A glucose apenas começa a ser consumida às 23,50 horas, no final da fase lag de crescimento. O consumo de glucose deu-se apenas durante a fase exponencial de crescimento, até às 185,50 horas. A concentração de biomassa residual apurada ao final do ensaio foi de 8,83 g/L. Considerando o consumo acentuado de glucose nas primeiras 185,50 horas, foi apurada uma taxa de consumo de substrato (r_s) de 0,05 g_{glucose}/(L.h).

Considerando a quantificação de PHA às 215,50 horas, e a respetiva concentração de glucose e biomassa total, verificou-se um rendimento de produto/substrato observado, ($Y_{\text{PHA/S}})_{\text{obs}}$, de 0,64 mPHA/mAçúcar e um rendimento de produto/biomassa observado, ($Y_{\text{PHA/X}})_{\text{obs}}$, de 0,21 mPHA/mX_{res}.

O pH inicial foi de 6,02. Durante a fase lag de crescimento, o pH aumentou até 6,23 e diminuiu até 5,97 às 23,50 horas. No período correspondente ao crescimento exponencial da biomassa, o pH manteve-se na gama [6,20-5,82]. Na fase de desaceleração do crescimento, às 161,50 horas, o pH diminuiu gradualmente até ao final do período de incubação, apresentando um valor final de 4,78 às 332,50 horas. Este valor é muito inferior ao indicado para a cultura. Ainda que tenha sido possível verificar valores elevados de biomassa e polímero, a manutenção de pH poderia melhorar os resultados do ensaio.

O filme obtido pela extração de PHAs produzidos neste ensaio, ilustrado na Figura 25, foi analisado por FTIR-ATR, e o respetivo espetro é apresentado na Figura 26.

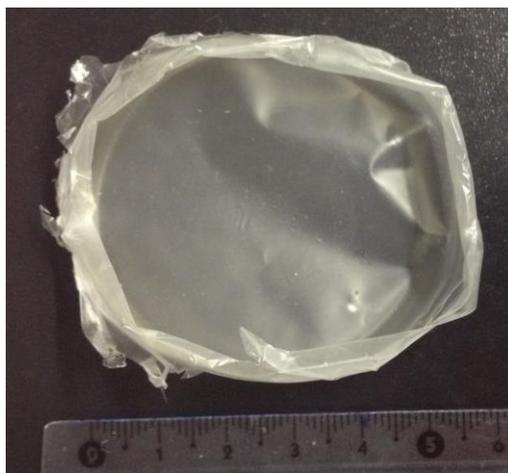


Figura 25: Filme obtido na extração do polímero produzido no ensaio de *H. mediterranei* em meio Fang 2% glucose.

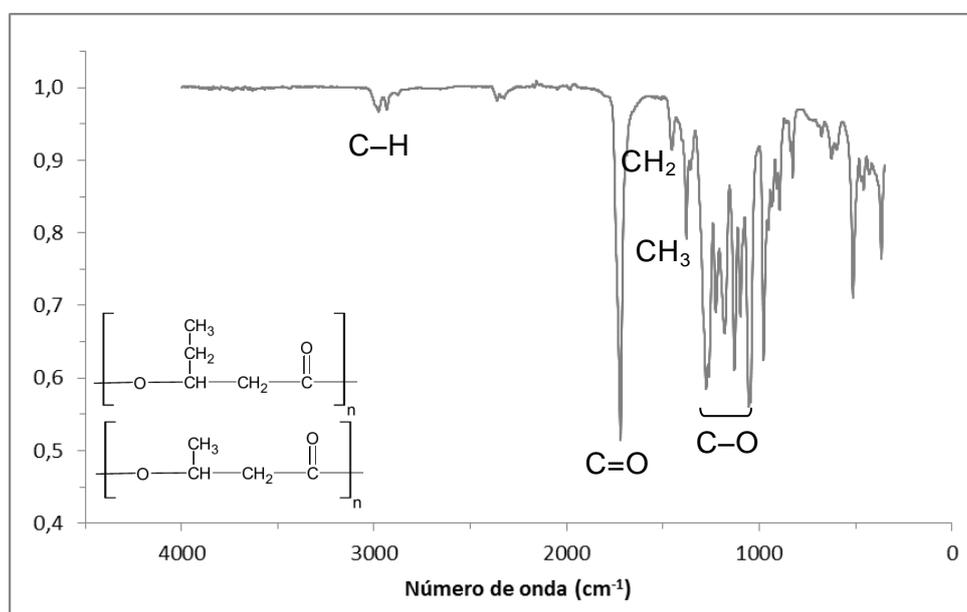


Figura 26: Espectro de FTIR-ATR do filme de PHA produzido por *H. mediterranei* em meio Fang 2% e estrutura dos monómeros 3HB e 3HV.

O espectro de FTIR-ATR do PHA produzido por *H. mediterranei* no presente trabalho apresenta um perfil semelhante ao obtido por Fernandez-Castilho *et al.* (1986) para um filme de PHA produzido por *H. mediterranei* com 0,1% (m/v) extrato de levedura e 1,0% (m/v) glucose.⁸⁴

Tabela 17: Resumo de parâmetros considerados na análise comparativa dos ensaios de *H. mediterranei* em meio sintético.

Referência	Presente trabalho		Lillo <i>et al.</i> (1990) ⁵⁷	
	1	2	1	2
% glucose (m/v)	1	2	1	2
$\mu_{\text{máxX}}$ (h ⁻¹)	0,06	0,06	n.d.	n.d.
$\mu_{\text{máxXres}}$ (h ⁻¹)	0,03	0,03	n.d.	n.d.
r_s (g/(L.h))	0,05	0,05	n.d.	n.d.
Glucose consumida (g)	7,21	9,13	n.d.	n.d.
r_p (g/(L.h))	0,03	0,03	n.d.	n.d.
[PHA] (g/L)	2,26 (87,25 horas)	4,89 (209,50 horas / máx)	3,09 (máx)	4,16 (máx)
$(Y_{P/S})_{\text{obs}}$ (m PHA/m S)	0,64	0,64	0,309	0,208
$(Y_{P/X})_{\text{obs}}$ (m PHA/m X _{res})	0,23	0,21	n.d.	n.d.
% P(3HB/3HV) (mPHA/mX)	18,39 (87,25 horas)	12,22 (90,00)	n.d.	n.d.
		17,21 (209,50 horas / máx)	n.d.	n.d.
%HB/PHA	89,78	90,04	n.d.	n.d.
%HV/PHA	10,22	9,96	n.d.	n.d.

n.d. – não definido

Para ambos os ensaios, as taxas de crescimento de biomassa total e residual, as taxas de consumo de substrato e de produção de PHA, e os rendimentos observados de produto/substrato e produto/biomassa apresentam o mesmo valor. Em ambos os ensaios o consumo de glucose foi verificado apenas no período correspondente ao crescimento exponencial de biomassa, com uma mesma taxa de consumo. Apesar do ensaio em meio com 2% glucose fornecer aproximadamente o dobro de glucose, não se verificou um aumento substancial de consumo, uma vez que no ensaio em meio com 2% glucose foram consumidas 9,13 g glucose, apenas mais 1,92 g glucose que no ensaio em meio com 1% glucose. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados por Lillo *et al.* (1990).⁵⁷ Os autores verificaram que o aumento da concentração de glucose não causa

necessariamente um aumento de concentração de PHA, e obtiveram os melhores resultados de acumulação com 2% glucose. De igual modo, nos ensaios realizados no presente trabalho, o aumento da concentração de glucose não alterou os valores dos parâmetros cinéticos, mas permitiu atingir valores mais elevados de acumulação. Deve ser referido que, não tendo sido possível quantificar o polímero toda a extensão do ensaio com 1% glucose, é muito provável que o valor de acumulação de PHA obtido não corresponda ao máximo. Na verdade, o valor de 2,26 g/L (18,39% mPHA/mX) obtido às 87,25 horas no ensaio com 1% glucose, ainda que inferior ao máximo obtido por Lillo *et al.* (1990) no ensaio com 1% glucose, 3,09 g/L, é superior ao obtido às 90,00 no ensaio com 2% glucose realizado neste trabalho, 1,98 g/L (12,22% mPHA/mX).

No ensaio com 2% glucose foi obtido a concentração mais elevada de PHA neste trabalho, 4,89 g/L (17,21% mPHA/mX). Este valor foi superior ao verificado por Lillo *et al.* (1990) no ensaio com 2% glucose, 4,16 g/L.

3.3. ENSAIOS EM MEIO EAF

Não foi possível realizar ensaios de produção de PHAs por *H. mediterranei* em meio EAF. A informação apresentada relativa ao comportamento de *H. mediterranei* incubada em EAF é referente aos pré-inóculos (P. I.) (Figura 27). Nos P.I.s foi apenas monitorizada a concentração de biomassa uma vez que seria o parâmetro de interesse para a inoculação posterior nos ensaios a realizar. Ainda que se tenha verificado um aumento na concentração de biomassa, este não foi significativo considerando o tempo de incubação (21 dias, P.I. 50% EAF; 30 dias, P.I. 100% EAF). Ao fim destes períodos verificou-se precipitação de sais e consequente desequilíbrio do meio, pelo que a incubação dos P.I.s foi forçosamente interrompida.

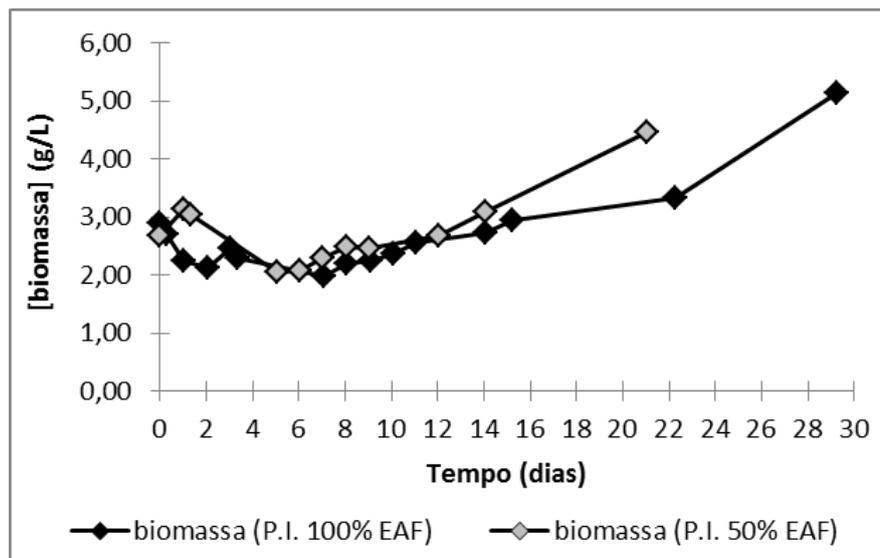


Figura 27: Variação da concentração de biomassa durante o período de incubação dos pré-inóculos de *H. mediterranei* em meio 100% EAF, e 50% EAF.

O facto de *H. mediterranei* não crescer em EAF deve-se muito provavelmente à presença de taninos no extrato, compostos fenólicos com capacidades antibacterianas.³ Bhattacharyya *et al.* (2012) estudaram a produção de PHAs por *H. mediterranei* em vinhoto de cana (também designado por vinhaça ou restilo) e verificaram que o crescimento microbiano era inibido pelas elevadas concentrações de compostos fenólicos. A realização de um pré-tratamento do resíduo com carbono ativado a pH 2,0 permitiu reduzir o conteúdo em compostos fenólicos. Em 96 horas de incubação de *H. mediterranei* em 50 % (v/v) de vinhoto pré-tratado ($48 \pm 1,5$ mg compostos fenólicos/L), a cultura acumulou 66 % de peso seco de biomassa em PHA, para um μ_{\max} de $0,12 \text{ h}^{-1}$.¹⁴³ O EAF poderá, no mesmo sentido, precisar de um pré-tratamento para poder ser usado na produção de PHAs por *H. mediterranei*. A diminuição da concentração de taninos deverá preferencialmente permitir a sua recuperação e posterior utilização.

CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES

Neste trabalho foi investigada a produção de PHAs por *C. necator* e *H. mediterranei* a partir de EAF, um subproduto da indústria vitivinícola. O conteúdo em açúcares do EAF caracterizado por GC-FID revelou glucose ($14,37 \pm 0,628$ g/L) e manose ($4,19 \pm 0,203$ g/L) como os principais monossacarídeos constituintes.

Foi realizado um ensaio preliminar de crescimento de *C. necator* em meio sintético com glucose (16,44 g/L) e manose (4,40 g/L), que confirmou a aptidão de crescimento e produção de PHAs por *C. necator* a partir dos açúcares predominantes no EAF. Verificou-se uma taxa específica de crescimento máxima de $0,06 \text{ h}^{-1}$, uma taxa de consumo de substrato de $0,40 \text{ g}_{\text{açúcares totais}}/(\text{L.h})$, e uma concentração de P(3HB) de 2,19 g/L, correspondente a 24,27% mPHB/mX.

Foram realizados ensaios de produção em meio EAF ($[X]_{\text{inicial}}$ de 0,70 g/L), em relação a um controlo em meio sintético MG ($[X]_{\text{inicial}}$ de 0,87 g/L). O ensaio em meio EAF resultou em concentrações de biomassa (6,99 g/L) e P(3HB) (0,34 g/L) inferiores às obtidas no ensaio controlo em meio MG (9,06 g/L e 4,36 g/L, respetivamente). Esta diferença pode ter derivado do facto de a concentração inicial de açúcares no meio MG ser superior. Foi realizado um segundo ensaio de produção em meio EAF, com uma concentração inicial de biomassa superior, 1,91 g/L. O aumento da concentração inicial de biomassa permitiu obter melhores resultados, apresentando uma concentração final de biomassa de 17,11 g/L e 30,38% PHA_{ext}. No geral, foram verificados valores inibitórios de pH em todos os ensaios de produção realizados com *C. necator* em EAF.

Foi realizado um ensaio de produção em reator com manutenção de pH. Foi usado 50% (v/v) EAF, o que resultou numa concentração inicial de glucose de 6,50 g/L, e uma concentração inicial de manose de 1,56 g/L. Verificou-se uma taxa de consumo de substrato de $3,40 \text{ g}_{\text{açúcares totais}}/(\text{L.h})$. O consumo imediato de quase toda a glucose e manose propõe a possibilidade de que *C. necator* tenha consumido outros componentes do EAF. A taxa específica de crescimento máxima foi de $0,18 \text{ h}^{-1}$, e a concentração final de biomassa foi de 1,83 g/L. Verificou-se um máximo de concentração de P(3HB) de 2,19 g/L, correspondente a 85,60 % mPHA/mX.

A análise FTIR-ATR do filme de polímero obtido em meio sintético revelou um perfil característico de P(3HB), com a presença de uma série de picos na gama [1000-

1300] cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação C – O do grupo éster, um pico aos 1379 cm^{-1} característico dos grupos CH_3 , um pico aos 1452 cm^{-1} correspondente à deformação assimétrica da ligação C – H nos grupos CH_2 , um pico aos 1720 cm^{-1} referente ao estiramento das ligações C=O associadas ao grupo éster e um pico na ordem dos [3000-2850] cm^{-1} correspondente a vibrações de estiramento característica dos alcanos nas ligações C – H. O espectro FTIR-ATR do filme obtido no ensaio em meio EAF revelou diferenças que podem ser associadas a resíduos provenientes do meio, mas apresentou um perfil que permitiu a identificação como P(3HB).

H. mediterranei revelou-se incapaz de crescer significativamente em EAF. Provavelmente o microrganismo foi inibido pela presença de taninos no meio. Nos ensaios em meio sintético (1% e 2% glucose), verificou-se o mesmo valor para a taxa de crescimento de biomassa total (0,06 h^{-1}) e residual (0,03 h^{-1}), taxa de consumo de substrato (0,05 $\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$) e taxa de produção de PHA (0,03 $\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$), e rendimento observado de produto/substrato (0,64 m/m) e produto/biomassa (0,19 m/m). No ensaio com 2% glucose foi obtido o melhor resultado de acumulação, 4,89 g/L P(3HB/3HV) (17,21% mPHA/mX). O polímero produzido por *H. mediterranei* foi identificado como P(3HB/3HV), constituído por 90,04% HB/ 9,96% HV.

Em suma, neste trabalho foi verificada pela primeira vez a adequação do EAF como meio para produção de PHAs. O melhor resultado foi obtido por *C. necator* em reator descontínuo com regulação de pH, com a acumulação de 85,60% P(3HB) (mPHA/mX). Estes resultados são uma contribuição valiosa no processo de valorização deste subproduto agroindustrial, e adjacente propósito de redução de custos na produção de PHAs.

CAPÍTULO V – PROPOSTAS DE TRABALHO FUTURO

No seguimento dos resultados obtidos neste trabalho, são sugeridos trabalhos futuros complementares e de continuidade como:

- Concentrar o EAF (*e. g.* osmose inversa, ultrafiltração), de modo a aumentar a concentração de açúcares. Na utilização do EAF concentrado como substrato deve ser tida em consideração a suscetibilidade dos microrganismos aos taninos, uma vez que a sua concentração também aumentaria, conseqüentemente. Assim, deverão ser escolhidas espécies tolerantes, como *C. necator*, ou proceder à remoção dos taninos para permitir a o uso de EAF por espécies intolerantes, como *H. mediterranei*.
- Realizar novos ensaios de produção por *C. necator* em meio EAF, com monitorização de amónia.
- Remover os taninos presentes no EAF (*e. g.* solventes seletivos, carvão ativado, resinas), para averiguação da capacidade de *H. mediterranei* crescer e produzir PHAs a partir de EAF.
- Realizar estudos de limitação nutricional para aumento do rendimento de produção.
- Complementar a análise por FTIR-ATR aos filmes de PHA com outras metodologias de caracterização estrutural.

CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Comissão Europeia, http://ec.europa.eu/agriculture/markets/wine/notices/index_en.htm (26/10/2013).
2. Comissão Europeia, Para um sector vitivinícola europeu sustentável - Fact Sheet. Direcção-Geral da Agricultura e do Desenvolvimento Rural, Serviço das Publicações Oficiais das Comunidades Europeias, Ed. 2007.
3. Mendes, J. A. S.; Xavier, A. M. R. B.; Evtuguin, D. V.; Lopes, L. P. C., Integrated utilization of grape skins from white grape pomaces. *Industrial Crops and Products* **2013**, 49, 286-291.
4. Choi, J.; Lee, S. Y., Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1999**, 51, (1), 13-21.
5. Keshavarz, T.; Roy, I., Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology* **2010**, 13, (3), 321-326.
6. Lu, Q.; Han, J.; Zhou, L.; Zhou, J.; Xiang, H., Genetic and Biochemical Characterization of the Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Synthase in *Haloferax mediterranei*. *Journal of Bacteriology* **2008**, 190, (12), 4173-4180.
7. U. S. Energy Information Administration (EIA); U.S. Department of Energy: Washington, DC 20585, April 2011.
8. Owen, N. A.; Inderwildi, O. R.; King, D. A., The status of conventional world oil reserves: Hype or cause for concern? *Energy Policy* **2010**, 38, (8), 4743-4749.
9. Cherubini, F., The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management* **2010**, 51, (7), 1412-1421.
10. IEA, International Energy Agency (IEA) Bioenergy Task 42 on Biorefineries. In Bioenergy, I. I. E. A., Ed. 2009.
11. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Química Verde no Brasil: 2010-2030. In Embrapa Agroindústria de Alimentos - Livros científicos (ALICE): Brasília, 2010; p 438.
12. Orts, W. J.; Nobes, G. A. R.; Kawada, J.; Nguyen, S.; Yu, G.-e.; Ravenelle, F., Poly(hydroxyalkanoates): Biorefinery polymers with a whole range of applications. The work of Robert H. Marchessault. *Canadian Journal of Chemistry* **2008**, 86, (6), 628-640.
13. Gullón, P.; Conde, E.; Moure, A.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Selected Process Alternatives for Biomass Refining: A Review. *The Open Agriculture Journal* **2010**, 4, 135-144.
14. Snell, K. D.; Peoples, O. P., PHA bioplastic: A value-added coproduct for biomass biorefineries. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **2009**, 3, (4), 456-467.
15. Thompson, R. C.; Swan, S. H.; Moore, C. J.; vom Saal, F. S., Our plastic age. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2009**, 364, (1526), 1973-1976.
16. Plastics Europe, Plastics - the Facts 2011. An analysis of European plastics production, demand and recovery for 2010; Plastics Europe - Association of Plastics Manufacturers, 2011.
17. Kuruppallil, Z., Green Plastics: An Emerging Alternative For Petroleum-Based Plastics. *International Journal Of Engineering Research & Innovation* **2011**, 3, (1), 59-64.
18. Endres, H.-J.; Siebert-Raths, A., *Engineering BioPolymers - Markets, Manufacturing, Properties and Applications*. Carl Hanser Verlag: 2011.

19. Chanprateep, S., Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2010**, 110, (6), 621-632.
20. Chen, G.-Q., A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews* **2009**, 38, (8), 2434.
21. European Bioplastics, Bioplastics - Facts and Figures. <http://en.european-bioplastics.org/>
22. Hänggi, U. J., Requirements on bacterial polyesters as future substitute for conventional plastics for consumer goods. *FEMS Microbiology Reviews* **1995**, 16, (2-3), 213-220.
23. Philip, S.; Keshavarz, T.; Roy, I., Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **2007**, 82, (3), 233-247.
24. Koller, M.; Salerno, A.; Dias, M.; Reiterer, A.; Brauneegg, G., Modern Biotechnological Polymer Synthesis: A Review. *Food Technology and Biotechnology* **2010**, 48, (3), 255-269.
25. Quillaguamán, J.; Guzmán, H.; Van-Thuoc, D.; Hatti-Kaul, R., Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2009**, 85, (6), 1687-1696.
26. 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* **2007**, 25, (2), 148-175.
27. Zhang, B.; Carlson, R.; Srienc, F., Engineering the Monomer Composition of Polyhydroxyalkanoates Synthesized in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **2006**, 72, (1), 536-543.
28. Williams, M. D.; Rahn, J. A.; Sherman, D. H., Production of a polyhydroxyalkanoate biopolymer in insect cells with a modified eucaryotic fatty acid synthase. *Applied and Environmental Microbiology* **1996**, 62, (7), 2540-6.
29. Sudesh, K.; Doi, Y., Molecular Design and Biosynthesis of Biodegradable Polyesters. *Polymers for Advanced Technologies* **2000**, 11, 865-872.
30. Singh, A. K.; Mallick, N., Enhanced production of SCL-LCL-PHA co-polymer by sludge-isolated *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7925. *Letters in Applied Microbiology* **2008**, 46, (3), 350-357.
31. Ojumu, T. V.; Yu, J.; Solomon, B. O., Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology* **2004**, 3, (1), 18-24.
32. Green, R., Current Strategies for Optimizing Polyhydroxyalkanoate Production in Bacterial Systems. *MMG 445 Basic Biotechnology eJournal* **2010**, 6, 1-6.
33. Madinson, L. L.; Huisman, G. W., Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **1999**, 63, (1), 21-53.
34. Koller, M.; Hesse, P.; Bona, R.; Kutschera, C.; Atlić, A.; Brauneegg, G., Biosynthesis of High Quality Polyhydroxyalkanoate Co- and Terpolyesters for Potential Medical Application by the Archaeon *Haloferax mediterranei*. *Macromolecular Symposia* **2007**, 253, (1), 33-39.
35. Hazer, B.; Steinbüchel, A., Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2007**, 74, (1), 1-12.
36. Don, T.-M.; Chen, C. W.; Chan, T.-H., Preparation and characterization of poly(hydroxyalkanoate) from the fermentation of *Haloferax mediterranei*. *The Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2006**, 17, (12), 1425-1438.
37. Anderson, A. J.; Dawes, E. A., Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews* **1990**, 54, (4), 450-472.

38. Tian, P.; Shang, L.; Ren, H.; Mi, Y.; Fan, D.; Jiang, M., Biosyntheses of polyhydroxyalkanoates: Current research and development. *African Journal of Biotechnology* **2009**, 8, (5), 709-714.
39. Lemoigne, M., Produits de deshydratation et de polymerization de l'acid β -oxybutyrique. *Bulletin de la Societe de Chimie Biologique* **1926**, 8, 770-782.
40. El-Hadi, A.; Schnabel, R.; Straube, E.; Müller, G.; Henning, S., Correlation between degree of crystallinity, morphology, glass temperature, mechanical properties and biodegradation of poly(3-hydroxyalkanoate) PHAs and their blends. *Polymer Testing* **2002**, 21, 665-674.
41. Amara, A. A., Polyhydroxyalkanoates from Basic Research and Molecular Biology to Application. *IUM Engineering Journal* **2008**, 9, (1).
42. Khanna, S.; Srivastava, A. K., Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry* **2005**, 40, (2), 607-619.
43. Lenz, R. W.; Marchessault, R. H., Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. *Biomacromolecules* **2005**, 6, (1), 1-8.
44. Laycock, B.; Halleya, P.; Pratt, S.; Werker, A.; Lant, P., The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science* **2013**, 38, 536-583.
45. Sudesh, K.; Abe, H.; Doi, Y., Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* **2000**, 25, 1503-1555.
46. Choi, J.; Lee, S. Y., Economic considerations in the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by bacterial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2000**, 53, 646-649.
47. Verlinden, R. A. J.; Hill, D. J.; Kenward, M. A.; Williams, C. D.; Radecka, I., Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology* **2007**, 102, (6), 1437-1449.
48. Tombolini, R.; Povolò, S.; Buson, A.; Squartini, A.; Nuti, M. P., Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biosynthetic genes in *Rhizobium meliloti* 41. *Microbiology* **1995**, 141, (10), 2553-2559.
49. Pilla, S., *Handbook of Bioplastics and Biocomposites Engineering Applications*. John Wiley & Sons: 2011.
50. Rehm, B. H. A., Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoate granules: a platform technology for the production of tailor-made bioparticles. *Current Issues in Molecular Biology* **2007**, 9, 41-62.
51. Grage, K.; Jahns, A. C.; Parlange, N.; Palanisamy, R.; Rasiah, I. A.; Atwood, J. A.; Rehm, B. H. A., Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. *Biomacromolecules* **2009**, 10, 660-669.
52. Kunasundari, B., Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polymer Letters* **2011**, 5, (7), 620-634.
53. Luengo, J. M.; García, B.; Sandoval, A.; Naharro, G.; Olivera, E. a. R., Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology* **2003**, 6, (3), 251-260.
54. Jurasek, L.; Marchessault, R. H., The Role of Phasins in the Morphogenesis of Poly(3-hydroxybutyrate) Granules. *Biomacromolecules* **2002**, 3, (2), 256-261.
55. Lee, S.; Choi, J.-i., Production of Microbial Polyester by Fermentation of Recombinant Microorganisms. In *Biopolyesters*, Babel, W.; Steinbüchel, A., Eds. Springer Berlin / Heidelberg: 2001; Vol. 71, pp 183-207.
56. Lee, S. Y., Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology* **1996**, 14, (11), 431-438.

-
57. Lillo, J. G.; Rodriguez-Valera, F., Effects of Culture Conditions on Poly(β -Hydroxybutyric Acid) Production by *Haloferax mediterranei*. *Applied and Environmental Microbiology* **1990**, 56, (8), 2517-2521.
58. Ramsay, B. A.; Lomaliza, K.; Chavarie, C.; Dubé, B.; Bataille, P.; Ramsay, J. A., Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids. *Applied and Environmental Microbiology* **1990**, 56, (7), 2093-2098.
59. Kim, T.-K.; Jung, Y.-M.; Vo, M. T.; Shioya, S.; Lee, Y.-H., Metabolic Engineering and Characterization of phaC1 and phaC2 Genes from *Pseudomonas putida* KCTC1639 for Overproduction of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate. *Biotechnology Progress* **2006**, 22, (6), 1541-1546.
60. Shozui, F.; Sun, J.; Song, Y.; Yamada, M.; Sakai, K.; Matsumoto, K. i.; Takase, K.; Taguchi, S., A New Beneficial Mutation in *Pseudomonas sp.* 61-3 Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthase for Enhanced Cellular Content of 3-Hydroxybutyrate-Based PHA Explored Using Its Enzyme Homolog as a Mutation Template. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2010**, 74, (8), 1710-1712.
61. Wong, M. S.; Causey, T. B.; Mantzaris, N.; Bennett, G. N.; San, K.-Y., Engineering poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer composition in *E. coli*. *Biotechnology and Bioengineering* **2008**, 99, (4), 919-928.
62. Andreeßen, B.; Lange, A. B.; Robenek, H.; Steinbüchel, A., Conversion of Glycerol to Poly(3-Hydroxypropionate) in Recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **2010**, 76, (2), 622-626.
63. 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* **1995**, 61, (1), 34-39.
64. Wong, H. H.; Lee, S. Y., Poly-(3-hydroxybutyrate) production from whey by high-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1998**, 50, (1), 30-33.
65. Fonseca, G. G.; Antonio, R. V., Plasmid Stability in PHA-Producing Recombinant *Escherichia coli* Strains *Journal of Biological Sciences* **2006**, 6, (5), 893-898.
66. Akaraonye, E.; Keshavarz, T.; Roy, I., Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **2010**, 85, (6), 732-743.
67. Koller, M.; Gasser, I.; Schmid, F.; Berg, G., Linking ecology with economy: Insights into polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms. *Engineering in Life Sciences* **2011**, 11, (3), 222-237.
68. Dias, J. M. L.; Lemos, P. C.; Serafim, L. S.; Oliveira, C.; Eiroa, M.; Albuquerque, M. G. E.; Ramos, A. M.; Oliveira, R.; Reis, M. A. M., Recent Advances in Polyhydroxyalkanoate Production by Mixed Aerobic Cultures: From the Substrate to the Final Product. *Macromolecular Bioscience* **2006**, 6, (11), 885-906.
69. Rhu, D. H.; Lee, W. H.; Kim, J. Y.; Choi, E., Polyhydroxyalkanoate (PHA) production from waste. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research* **2003**, 48, (8), 221-8.
70. Carucci, A.; Dionisi, D.; Majone, M.; Rolle, E.; Smurra, P., Aerobic storage by activated sludge on real wastewater. *Water Research* **2001**, 35, (16), 3833-3844.
71. Serafim, L. s. S.; Lemos, P. C.; Oliveira, R.; Reis, M. A. M., Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnology and Bioengineering* **2004**, 87, (2), 145-160.
-

72. Serafim, L. S.; Lemos, P. C.; Albuquerque, M. G. E.; Reis, M. A. M., Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2008**, 81, (4), 615-628.
73. Vandamme, P., Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **2004**, 54, (6), 2285-2289.
74. Makkar, N. S.; Casipa JR., L. E., *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.: a Nonobligate Bacterial Predator of Bacteria in Soil. *International Journal of Systematic Bacteriology* **1987**, 323-326.
75. Repaske, R., Nutritional Requirements for *Hydrogenomonas eutropha*. *Journal of Bacteriology* **1962**, 83, (2), 418-422.
76. Kunioka, M.; Kawaguchi, Y.; Doi, Y., Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1989**, 30, 569-573.
77. Saito, Y.; Nakamura, S.; Hiramitsu, M.; Doi, Y., Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Polymer International* **1996**, 39, 169-174.
78. Linko, S.; Vaheri, H.; Seppälä, J., Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus* on different carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1993**, 39, (1), 11-15.
79. Khosravi-Darani, K.; Mokhtari, Z.-B.; Amai, T.; Tanaka, K., Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C1 carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2013**, 97, (4), 1407-1424.
80. Fukui, T.; Doi, Y., Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1998**, 49, (3), 333-336.
81. Obruca, S.; Marova, I.; Snajdar, O.; Mravcova, L.; Svoboda, Z., Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate. *Biotechnology Letters* **2010**, 32, (12), 1925-1932.
82. Yu, J.; Stahl, H., Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. *Bioresource Technology* **2008**, 99, (17), 8042-8048.
83. Oren, A., Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* **2008**, 4, (2).
84. Fernandez-Castillo, R.; Rodriguez-Valera, F.; Gonzalez-Ramos, J.; Ruiz-Berraquero, F., Accumulation of Poly(β -Hydroxybutyrate) by Halobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **1986**, 51, (1), 214-216.
85. Huang, T.-Y.; Duan, K.-J.; Huang, S.-Y.; Chen, C. W., Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by *Haloferax mediterranei*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2006**, 33, (8), 701-706.
86. Chen, C. W.; Don, T.-M.; Yen, H.-F., Enzymatic extruded starch as a carbon source for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *Process Biochemistry* **2006**, 41, (11), 2289-2296.
87. Koller, M.; Hesse, P.; Bona, R.; Kutschera, C.; Atlić, A.; Brauneegg, G., Potential of Various Archae- and Eubacterial Strains as Industrial Polyhydroxyalkanoate Producers from Whey. *Macromolecular Bioscience* **2007**, 7, (2), 218-226.
88. D'Souza, S. E.; Altekar, W.; D'Souza, S. F., Adaptive response of *Haloferax mediterranei* to low concentrations of NaCl (<20%) in the growth medium. *Archives of Microbiology* **1997**, 168, (1), 68-71.

89. Hezayen, F. F.; Rehm, B. H. A.; Eberhardt, R.; Steinbüchel, A., Polymer production by two newly isolated extremely halophilic archaea: application of a novel corrosion-resistant bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2000**, 54, (3), 319-325.
90. Antón, J.; Meseguer, I.; Rodríguez-Valera, F., Production of an Extracellular Polysaccharide by *Haloflex mediterranei*. *Applied and Environmental Microbiology* **1988**, 54, (10), 2381-2386.
91. Nicolaus, B.; Kambourova, M.; Oner, E. T., Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology. *Environmental Technology* **2010**, 31, (10), 1145-1158.
92. Parolis, H.; Parolis, L. A.; Boán, I. F.; Rodríguez-Valera, F.; Widmalm, G.; Manca, M. C.; Jansson, P. E.; Sutherland, I. W., The structure of the exopolysaccharide produced by the halophilic Archaeon *Haloflex mediterranei* strain R4 (ATCC 33500). *Carbohydrate Research* **1996**, 295, 147-156.
93. Ryu, H. W.; Hahn, S. K.; Chang, Y. K.; Chang, H. N., Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. *Biotechnology and Bioengineering* **1997**, 55, (1), 28-32.
94. Koyama, N.; Doi, Y., Continuous production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnology Letters* **1995**, 17, (3), 281-284.
95. Durner, R.; Zinn, M.; Witholt, B.; Egli, T., Accumulation of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas oleovorans* during growth in batch and chemostat culture with different carbon sources. *Biotechnology and Bioengineering* **2001**, 72, (3), 278-288.
96. Ienczak, J. L.; Schmidell, W.; Aragão, G. M. F., High-cell-density culture strategies for polyhydroxyalkanoate production: a review. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2013**, 40, (3-4), 275-286.
97. Kessler, B.; Weusthuis, R.; Witholt, B.; Eggink, G., Production of Microbial Polyesters: Fermentation and Downstream Processes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **2001**, 71, 159-182.
98. Jacquelin, N.; Lo, C.-W.; Wei, Y.-H.; Wu, H.-S.; Wang, S. S., Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal* **2008**, 39, (1), 15-27.
99. Zinn, M.; Witholt, B.; Egli, T., Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 53, 5- 21.
100. Bucci, D. Z.; Tavares, L. B. B.; Sell, I., PHB packaging for the storage of food products. *Polymer Testing* **2005**, 24, (5), 564-571.
101. Lauzier, C. A.; Monasterios, C. J.; Saracovan, I.; Marchessault, R. H.; Ramsay, B. A., Film formation and paper coating with poly ([beta]-hydroxyalkanoate), a biodegradable latex. *Tappi Journal* **1993**, 76, (5), 71-77.
102. Bourbonnais, R.; Marchessault, R. H., Application of Polyhydroxyalkanoate Granules for Sizing of Paper. *Biomacromolecules* **2010**, 11, 989-993.
103. Voinova, O. N.; Kalacheva, G. S.; Grodnitskaya, I. D.; Volova, T. G., Microbial polymers as a degradable carrier for pesticide delivery. *Applied Biochemistry and Microbiology* **2009**, 45, (4), 384-388.
104. Chen, G.-Q.; Wu, Q., The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* **2005**, 26, (33), 6565-6578.
105. Lee, S. Y.; Lee, Y.; Wang, F., Chiral compounds from bacterial polyesters: Sugars to plastics to fine chemicals. *Biotechnology and Bioengineering* **1999**, 65, (3), 363-368.
106. Zhang, L.; Deng, X.; Zhao, S.; Huang, Z., Biodegradable polymer blends of poly(3-hydroxybutyrate) and hydroxyethyl cellulose acetate. *Polymer* **1997**, 38, (24), 6001-6007.

107. Jendrossek, D.; Handrick, R., Microbial degradation of Polyhydroxyalkanoates. *Annual Review of Microbiology* **2002**, 56, (1), 403-432.
108. Reddy, C. S. K.; Ghai, R.; Rashmi; Kalia, V. C., Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology* **2003**, 87, 137-146.
109. Luzier, W. D., Materials derived from biomass/biodegradable materials. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1992**, 89, (3), 839-842.
110. Barnes, D. K. A.; Galgani, F.; Thompson, R. C.; Barlaz, M., Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2009**, 364, (1526), 1985-1998.
111. Arcos-Hernandez, M. V.; Laycock, B.; Pratt, S.; Donose, B. C.; Nikolić, M. A. L.; Luckman, P.; Werker, A.; Lant, P. A., Biodegradation in a soil environment of activated sludge derived polyhydroxyalkanoate (PHBV). *Polymer Degradation and Stability* **2012**, 97, (11), 2301-2312.
112. Boyandin, A. N.; Rudnev, V. P.; Ivonin, V. N.; Prudnikova, S. V.; Korobikhina, K. I.; Filipenko, M. L.; Volova, T. G.; Sinskey, A. J., Biodegradation of Polyhydroxyalkanoate Films in Natural Environments. *Macromolecular Symposia* **2012**, 320, (1), 38-42.
113. Bonartsev, A. P.; Myshkina, V. L.; Nikolaeva, D. A.; Furina, E. K.; Makhina, T. A.; Livshits, V. A.; Boskhomdzhev, A. P.; Ivanov, E. A.; Iordanskii, A. L.; Bonartseva, G. A., Biosynthesis, biodegradation, and application of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers – natural polyesters produced by diazotrophic bacteria. In *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, (Ed.), Formatex, Spain, ed.; Mendez-Vilas, A. E., Ed. Formatex, Spain: 2007; Vol. 1, pp 295-307.
114. Akiyama, M.; Tsuge, T.; Doi, Y., Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation. *Polymer Degradation and Stability* **2003**, 80, (1), 183-194.
115. Kim, S.; Dale, B., Life Cycle Assessment Study of Biopolymers (Polyhydroxyalkanoates) - Derived from No-Tilled Corn. *The International Journal of Life Cycle Assessment* **2005**, 10, (3), 200-210.
116. Devesa-Rey, R.; Vecino, X.; Varela-Alende, J. L.; Barral, M. T.; Cruz, J. M.; Moldes, A. B., Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. *Waste Management* **2011**, 31, (11), 2327-2335.
117. FAOSTAT - FAO Statistics Division. <http://faostat.fao.org> (26/10/2013).
118. Peralbo-Molina, Á.; Luque de Castro, M. D., Potential of residues from the Mediterranean agriculture and agrifood industry. *Trends in Food Science & Technology* **2013**, 32, (1), 16-24.
119. Romeu, V.; Cardoso, V.; Peixoto, F., Valorização integrada dos bioprodutos da indústria vitivinícola: Novas oportunidades de desenvolvimento regional. *Boletim de Biotecnologia* **2013**, Abril, 18-19.
120. Schieber, A.; Stintzing, F. C.; Carle, R., By-products of plant food processing as a source of functional compounds — recent developments. *Trends in Food Science & Technology* **2001**, 12, (11), 401-413.
121. Mendes, J. A. S.; Prozil, S. O.; Evtuguin, D. V.; Lopes, L. P. C., Towards comprehensive utilization of winemaking residues: Characterization of grape skins from red grape pomaces of variety Touriga Nacional. *Industrial Crops and Products* **2013**, 43, 25-32.
122. Yu, J.; Ahmedna, M., Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science & Technology* **2013**, 48, (2), 221-237.

123. Koller, M.; Atlić, A.; Dias, M.; Reiterer, A.; Braunege, G., Microbial PHA Production from Waste Raw Materials. In *Plastics from Bacteria*, Chen, G. G.-Q., Ed. Springer Berlin Heidelberg: 2010; Vol. 14, pp 85-119.
124. Ruberto, G.; Renda, A.; Amico, V.; Tringali, C., Volatile components of grape pomaces from different cultivars of Sicilian *Vitis vinifera* L. *Bioresource Technology* **2008**, 99, (2), 260-268.
125. Fontana, A. R.; Antonioli, A.; Bottini, R., Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, 61, (38), 8987-9003.
126. Nerantzis, E. T.; Tataridis, P., Integrated enology - utilization of winery wastes for the production of high added value products. *e-Journal of Science & Technology* **2006**, 1, (3), 79-89.
127. Peralbo-Molina, Á.; Priego-Capote, F.; Dolores Luque de Castro, M., Comparison of extraction methods for exploitation of grape skin residues from ethanol distillation. *Talanta* **2012**, 101, 292-298.
128. Ali, K.; Maltese, F.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R., Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochemistry Reviews* **2009**, 9, (3), 357-378.
129. Silva, L. M., Caracterização dos Subprodutos da Vinificação. *Spectrum Millenium* **2003**, 28, 123-133.
130. Carreira, P.; Mendes, J. A. S.; Trovatti, E.; Serafim, L. S.; Freire, C. S. R.; Silvestre, A. J. D.; Neto, C. P., Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. *Bioresource Technology* **2011**, 102, (15), 7354-7360.
131. Fang, C.-J.; Ku, K.-L.; Lee, M.-H.; Su, N.-W., Influence of nutritive factors on C50 carotenoids production by *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 with two-stage cultivation. *Bioresource Technology* **2010**, 101, (16), 6487-6493.
132. Lemos, P. C.; Serafim, L. S.; Reis, M. A. M., Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. *Journal of Biotechnology* **2006**, 122, (2), 226-238.
133. Ostle, A. G.; Holt, J. G., Nile blue A as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology* **1982**, 44, (1), 238-241.
134. Coates, J., Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, (Ed.), R. A. M., Ed. John Wiley & Sons Ltd: Chichester, 2000; pp 10815-10837.
135. Oliveira, F. C.; Dias, M. L.; Castilho, L. R.; Freire, D. M. G., Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation. *Bioresource Technology* **2007**, 98, (3), 633-638.
136. Fereidouni, M.; Younesi, H.; Daneshi, A.; Sharifzadeh, M., The effect of carbon source supplementation on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator*. *Biotechnol Appl Biochem* **2011**, 58, (3), 203-11.
137. Berezina, N., Novel approach for productivity enhancement of polyhydroxyalkanoates (PHA) production by *Cupriavidus necator* DSM 545. *New Biotechnology* **2013**, 30, (2), 192-195.
138. Khanna, S.; Srivastava, A. K., Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry* **2005**, 40, (6), 2173-2182.
139. Bosco, F.; Chiampo, F., Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) using milk whey and dairy wastewater activated sludge. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2010**, 109, (4), 418-421.
140. Booth, I. R., Regulation of Cytoplasmic pH in Bacteria. *Microbiological Reviews* **1985**, 49, (4), 359-378.

141. Riedel, S. L.; Bader, J.; Brigham, C. J.; Budde, C. F.; Yusof, Z. A. M.; Rha, C.; Sinskey, A. J., Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by *Ralstonia eutropha* in high cell density palm oil fermentations. *Biotechnology and Bioengineering* **2012**, 109, (1), 74-83.
142. Zahari, M. A. K. M.; Zakaria, M. R.; Ariffin, H.; Mokhtar, M. N.; Salihon, J.; Shirai, Y.; Hassan, M. A., Renewable sugars from oil palm frond juice as an alternative novel fermentation feedstock for value-added products. *Bioresource Technology* **2012**, 110, 566-571.
143. Bhattacharyya, A.; Pramanik, A.; Maji, S.; Haldar, S.; Mukhopadhyay, U.; Mukherjee, J., Utilization of vinasse for production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *AMB Expr* **2012**, 2, (1), 1-10.