



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

CAMILA SOUZA DE ANDRADE

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES
MULTILAYER A PARTIR DE POLIHIDROXIALCANOATOS,
HIDROCOLOIDES E SORO DE LEITE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL

**DOURADOS/MS
MARÇO/2015**

CAMILA SOUZA DE ANDRADE

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES
MULTILAYER A PARTIR DE POLIHIDROXIALCANOATOS,
HIDROCOLOIDES E SORO DE LEITE**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. GUSTAVO GRACIANO FONSECA
CO-ORIENTADOR: WILLIAM RENZO CORTEZ VEGA**

Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia na área de concentração em Tecnologia Ambiental.

DOURADOS/MS

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

A553d	Andrade, Camila Souza de. Desenvolvimento e caracterização de filmes multilayer a partir de polihidroxialcanoatos, hidrocoloides e soro de leite. / Camila Souza de Andrade. – Dourados, MS : UFGD, 2015. 54f. Orientadora: Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados. 1. Cinética. 2. Polihidroxialcanoatos. 3. Filmes. I. Título. CDD – 541.39
-------	--


Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

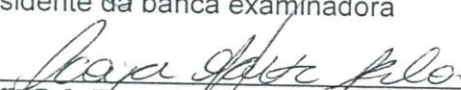


Termo de Aprovação


Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Desenvolvimento de filmes a partir de polihidroxialcanoatos produzidos por *Burkholderia sacchari* LFM 101 e gelatina e soro de queijo”**, de autoria de **Camila Souza de Andrade**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca
Presidente da banca examinadora



Prof.^a Dr.^a Farayde Matta Fakhouri
Membro Examinador (UFGD)



Prof. Dr. Marcelo Fossa da Paz
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 27 de Março de 2015.

“Deus ajuda quem a si próprio ajuda.”
I ching, Livro das mutações.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Deus, por ter me dado forças e me mostrar o quanto sou forte, mesmo parecendo tão fraca.

Aos meus pais pelo incentivo e por me ensinarem que tudo nesta vida é possível, e que a distância não é nada comparado ao amor de vocês por mim. Sou e serei eternamente grata por tudo que fazem e já fizeram por mim!

Ao meu irmão Irineu que é um anjo enviado por Deus, que sempre está por perto para me ajudar e cuidar de mim, e me mostrar que no mundo ainda existem pessoas boas! Aos meus tios Diana, Helenildo e Eleni que são mais que tios, são meus segundo pais e em especial meu primo e amigo Cauê, que me ajudou muito nestes dois anos de mestrado, fazendo com que acreditasse mais em mim e em Deus. E também meu primo Jefferson por ter me aguentado durante quatro anos, sei que não foi nada fácil, rsrs.

Ao meu namorado, Marcel, pelo incentivo e força durante esta caminhada que não foi fácil, e por me mostrar que com a fé vamos longe! E também a sua família, que sempre me ajudou em todos os momentos!

Aos professores Gustavo Graciano Fonseca e William Renzo Cortez, pela orientação no decorrer do mestrado.

Aos meus amigos distantes, porém sempre presentes no decorrer da minha vida: Josiane, Fernando, Larissa, Fernanda, Solange, Poliana... Obrigado amigos, sem vocês as férias em Rondônia ou em Teodoro não teriam graça!

Aos meus companheiros de laboratório que direta ou indiretamente me ajudaram no decorrer da minha pesquisa. Gostaria de agradecer em especial a Cinthia e Janina que me ajudaram muito no início do mestrado, sem vocês não saberia nada, rs! A Valkirea que foi meu braço direito no mestrado, me ajudando e solucionando minhas dúvidas (Família Bactéria) e a Tairine que se tornou uma grande amiga e parceira, me ajudando muito em todos os sentidos (Cris e Greg).

A professora Farayde por toda ajuda e dedicação neste trabalho, obrigado pelo carinho e risadas. A senhora tem um coração de ouro com diamante!

Ao professor Adão pela doação do soro de leite para realização desta pesquisa.

A Bel que esteve comigo na faculdade nos finais de semana, feriados e etc... Irei sentir falta das conversas!

Aos familiares e amigos que me deram força e contribuíram de alguma forma durante este ciclo da minha vida que se finaliza agora!

“Eu sinto que sei que sou um tanto bem maior...(OTM)”

Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 Objetivos	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Polihidroxicanoatos (PHA)	2
2.2 <i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101.....	3
2.3 Desenvolvimento de estratégias para produção de PHA	3
2.4 Produções de PHA a partir do soro do leite	4
2.5 Produção de biofilmes a base de gelatina, soro de leite e PHA	6
2.6 Referências.....	8
3 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....	15
3.1 Introdução.....	16
3.2 Materiais e métodos.....	17
3.2.1 Meios e condições de cultivo.....	17
3.2.2 Métodos analíticos	18
3.2.2.1 Densidade óptica	18
3.2.2.2 Determinação de massa celular seca (MCS)	18
3.2.2.3 Análise de cromatografia líquida de alta eficiência	18
3.2.2.5 Extração de PHA.....	20
3.2.3 Cálculo dos parâmetros cinéticos.....	20
3.2.3.1 Velocidade específica de crescimento celular (μ_{max}).....	20
3.2.3.2 Produtividade máxima em célula (P_{max})	20
3.2.3.3 Concentração máxima da biomassa (X_{max})	20
3.2.3.4 Velocidade específica de consumo de substrato (μ_s)	20
3.2.3.5 Fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$)	21
3.2.4 Elaboração de filmes multilayer	21
3.2.5 Características do filme	21
3.2.5.1 Aspecto visual.....	21
3.2.5.2 Espessura	22
3.2.5.3 Opacidade.....	22

3.2.5.4	Análise de cor	22
3.2.6	Propriedades físico-químicas	23
3.2.6.1	Solubilidade em água	23
3.2.6.2	Solubilidade em ácido	23
3.2.7	Propriedades de barreira	23
3.2.7.1	Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	23
3.2.8	Propriedades mecânicas.....	24
3.2.8.1	Resistência à tração e alongação	24
3.2.8.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	24
3.2.8.3	Difratometria de raios-X	24
3.2.9	Propriedades térmicas.....	24
3.2.9.1	Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	25
3.2.10	Análise estatística	25
3.3	Resultados e discussão.....	25
3.3.2	Análise dos parâmetros cinéticos <i>B. sacchari</i> LFM 101 em diferentes temperaturas e substratos	25
3.3.3	Caracterização dos filmes compostos a partir de polihidroxicanoatos e soro de queijo	31
3.3.3.1	Propriedades dos filmes <i>multilayer</i>	31
3.3.3.2	Cor e opacidade	35
3.3.3.3	Propriedades mecânicas	37
3.3.3.4	Propriedades térmicas	38
3.4	Conclusão	46
3.5	Referências.....	47
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	54

LISTA DE ABREVIATURAS

μ_{max} : Velocidade específica máxima de crescimento celular

μ_s : Velocidade específica de consumo de substrato

ABIPLAST: Associação Brasileira da Indústria de Plástico

C.N: Caldo nutriente

D.O: Densidade óptica

DSC: Calorimetria diferencial de varredura

GLC: Glicose

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LAC: Lactose

MCS: Massa celular seca

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

M.M: Meio mineral

P(3HB): poli(3-hidroxi-butirato)

PHA: Polihidroxi-álcanoato(s)

P_{max} : Produtividade máxima em célula

PVA: Permeabilidade ao vapor de água

T: Tempo

T.D.: Tempo de duplicação

X_{max} : Concentração máxima da biomassa

$Y_{X/S}$: Fator de conversão de substrato em célula

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Cinéticas de crescimento, consumo de substrato de <i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101 para cultivos a 30°C e 35°C com glicose..	27
Figura 2. Cinéticas de crescimento e consumo de substrato de <i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101 para cultivos a 30°C e 35°C com glicose e soro de leite..	28
Figura 3. Cinéticas de crescimento e consumo de substrato de <i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101 para cultivos a 30°C e 35°C com lactose como co-substrato.....	29
Figura 4. PHA Puro	32
Figura 5. PHA/Soro 3%.....	32
Figura 6. PHA/Soro 5%.....	33
Figura 7. Análise da variância de opacidade dos biofilmes.....	37
Figura 8. DSC transição vítrea dos filmes compostos por PHA, soro de leite e gelatina 3%.....	39
Figura 9. DSC transição endotérmica dos biofilmes compostos por PHA, soro de leite e gelatina 5%.	40
Figura 10. DSC transição vítrea dos filmes compostos por PHA, soro de leite e gelatina 5%.....	41
Figura 11. DSC transição endotérmica dos filmes compostos por PHA, soro de leite e gelatina 5%.	41
Figura 12. Difração de raios-X nas amostras de filmes de PHA/Soro 3%.....	42
Figura 13. Difração de raios-X nas amostras de filmes de PHA/Soro 5%.....	43
Figura 14. Difração de raios-X nas amostras de filmes de PHA puro.	44
Figura 15. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de filmes PHA/Soro 3% (Imagem (a) superfície; Imagem (b) ruptura).....	45
Figura 16. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura do filme PHA/Soro 5% (Imagem (a) superfície; Imagem (b) ruptura).....	45
Figura 17. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura do filme PHA puro (Imagem (a) superfície; Imagem (b) ruptura).....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros cinéticos de cultivo de <i>B. sacchari</i> LFM 101 em meio mineral com glicose, soro de leite e glicose/lactose.	26
Tabela 2. Caracterização e rendimento em polímero (PHA) <i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101 para cultivos a 30°C e 35°C com glicose e soro de leite.	30
Tabela 3. Espessura e permeabilidade e vapor de água (PVA) dos filmes compostos de PHA, gelatina e soro de leite.	33
Tabela 4. Análise de solubilidade em água e ácido das amostras entre o “branco” PHA e PHA/Soro 3 e 5%.	35
Tabela 5. Análise de cor das amostras entre o PHA/Soro 3 e 5%	36
Tabela 6. Propriedades mecânicas dos filmes entre o “branco” PHB, PHB/Soro 3% e 5%.	37

Andrade, C. S. **Desenvolvimento e caracterização de filmes *multilayer* a partir de polihidroxialcanoatos, hidrocoloides e soro de leite.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2015.

Resumo: É de extrema importância o uso de alternativas sustentáveis para a diminuição dos resíduos no meio ambiente. Neste trabalho estudou-se a fisiologia *Burkholderia sacchari* LFM 101, em termos cinéticos, usando a glicose como fonte de carbono e o soro de leite como co-substrato, a 30 e 35°C. Através dos ensaios realizados com a *B. sacchari*, observou-se que os cultivos utilizando glicose como única fonte de carbono a 35°C alcançou melhores resultados de parâmetros cinéticos em relação aos outros ensaios. Os cultivos realizados com glicose e soro de leite obtiveram valores inferiores aos cultivos utilizando glicose como única fonte de carbono. A partir destes dados avaliou-se o perfil de crescimento da lactose como co-substrato, haja vista que a lactose é o principalmente componente do soro de leite, e que a mesma indicava que poderia estar reprimindo o consumo da glicose nos cultivos contendo soro de leite. No entanto, a lactose se manteve constante no decorrer dos cultivos e não afetou o consumo de glicose. Estes resultados mostraram que a *B. sacchari* tem melhor desempenho em glicose, possuindo um maior rendimento em PHB a 35°C, neste sentido optou-se por esta temperatura para produção de PHA em larga escala, e posteriormente elaboração dos biofilmes. Como o soro de leite não foi tão eficiente como um co-substrato para produção de PHA e é um resíduo rico em nutrientes, utilizou o mesmo para elaboração de filmes *multilayer*, avaliando suas propriedades mecânicas, físicas, térmicas e de barreiras. Para elaboração dos filmes *multilayer* foram utilizadas uma solução filmogênica contendo gelatina e soro de leite, plastificadas por glicerol. A partir dos resultados nota-se que os filmes *multilayer* apresentaram valores superiores ao filme padrão de PHA puro, e os filmes contendo soro de leite e maior concentração de gelatina mostraram melhores propriedades físicas, mecânicas, térmicas e estruturais.

Palavras-chave: Cinética, polihidroxialcanoatos; filmes.

Andrade, C. S. **Development and characterization of multilyer films based on PHA, hydrocolloids and cheese whey.** Dissertation (Master in Environmental Science and Technology) - Federal University of Grande Dourados, Dourados, 2015.

Abstract: It is of utmost importance to use sustainable alternatives for the reduction of waste in the environment. We studied the physiology *Burkholderia sacchari* LFM 101 in kinetic terms, using glucose as the carbon source and whey as co-substrate at 30 to 35 °C. Through trials with *B. sacchari*, it was observed that the cultures using glucose as the sole carbon source at 35 °C presented the best results achieved kinetic parameters compared to other assays. The cultures performed with glucose and whey obtained values lower than crops using glucose as sole carbon source. From these data we assessed the growth profile of lactose as co-substrate, given that mainly lactose and whey component, and that it could be indicated that suppressing the glucose uptake in cultures containing cheese whey. However, lactose has remained constant over the cultures and did not affect the glucose consumption. These results showed that *B. sacchari* metabolizes better glucose, presenting a higher yield of PHB at 35 °C. This condition was chosen for the production of PHAs on a larger scale for later develops the biofilms. As the whey was not as efficient as a co-substrate for PHA production and is a residue rich in nutrients, it was used to prepare the same multilayer film, evaluating the mechanical, physical, and thermal barriers. For preparation of multilayer films were prepared one phylogenetic solution containing gelatin and whey, plasticized by glycerol. From the results it is noted that films multilayer had values above the standard of pure PHA film and films containing whey and highest concentration of gelatin showed better physical, mechanical, thermal and structural properties.

Key words: Kinetics, polyhydroxyalkanoates; films.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Esta dissertação apresenta as atividades realizadas pela aluna Camila Souza de Andrade durante o mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). O mestrado ocorreu de maio de 2013 a março de 2015.

Destaca-se que o presente trabalho surgiu da necessidade de estudar a criação de um filme feito a partir de polihidroxialcanoatos (PHA) e soro de leite, como forma de reaproveitamento do resíduo soro e a diminuição no acúmulo de plástico sintéticos no meio ambiente.

O texto foi estruturado da seguinte forma: introdução geral (Capítulo 1), revisão de literatura (Capítulo 2), desenvolvimento do trabalho (Capítulo 3) e conclusão geral (Capítulo 4).

1.1 Objetivos

O objetivo geral do trabalho foi desenvolver e caracterizar filmes multicamadas obtidos a partir de polihidroxialcanoatos adicionados ou não de hidrocolóides. Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a capacidade de crescimento do microrganismo *Burkholderia sacchari* utilizando soro do queijo como suplemento, visando à produção de polihidroxialcanoatos (PHA);
- Extrair e caracterizar os PHA obtidos;
- Obter biofilmes a partir de PHA, gelatina e soro de leite em duas diferentes concentrações;
- Caracterizar o filme a partir das suas propriedades físicas e mecânicas;
- Caracterizar as propriedades estruturais do filme através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difratometria de raios-X;
- Caracterizar os filmes através das suas propriedades térmicas através de calorimetria diferencial de varredura (DSC).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Polihidroxicanoatos (PHA)

Os avanços da ciência e da tecnologia exigem uma variedade de novos polímeros com bom desempenho e baixo custo (CAMARGO et al., 2012). Neste sentido, há uma necessidade da substituição dos polímeros convencionais por biopolímeros, que tem por característica principal sua biodegradabilidade. Entre os candidatos para plásticos biodegradáveis, os polihidroxicanoatos (PHA) vêm chamando muita atenção por causa de suas propriedades semelhantes às dos plásticos convencionais e também por possuírem completa biodegradabilidade (LEE, 1996).

As propriedades dos PHA dependem de vários fatores, tais como a linhagem de microrganismos, tipo de substrato utilizado, condições de operação do processo produtivo, composição e modificações posteriores à reação de síntese, como a inserção de grupos funcionais (LUVIZETTO, 2007). A utilização dos PHA é importante por que contém características mais apropriadas que tornam sua produção mais vantajosa tanto a curto, como médio e longo prazo (LOPES, 2010).

Existem mais de 100 tipos diferentes de PHA cuja variação depende da estrutura da cadeia lateral ou do número de átomos de carbono entre as duas ligações éster. A estrutura geral do PHA apresenta grupamento R incluindo cadeias laterais de carbono, contendo até 13 átomos de carbono ramificados e insaturados, também são formadas cadeias laterais de carbono, bem como diferentes grupos funcionais.

O primeiro polímero da família dos PHA a ser estudado foi o homopolímero poli-hidroxibutirato (PHB), composto por unidades monoméricas de quatro átomos de carbono (SILVA et al., 2007). De todos os PHAs conhecidos, o polidroxibutirato (PHB) é o mais estudado e caracterizado, sendo mais amplamente encontrado em bactérias (FONSECA, 2003).

Atualmente, biopolímeros feitos a partir de PHA já estão disponíveis comercialmente, sendo produzidos industrialmente por sistemas de cultura pura, operados sob condições assépticas e fornecidos com meios quimicamente definidos. No entanto, os custos associados a estas condições operacionais faz

com que aumente o preço dos PHA's, limitando sua aplicação, fazendo que haja a substituição pelos plásticos tradicionais (FRADINHO et al., 2014).

De fato, o custo para a produção dos PHA irá depender do microrganismo do seu rendimento e produtividade, das fontes de carbono, das condições de cultivo e os processo de recuperação e purificação, sendo que as fontes de carbono são responsáveis por 25 a 45% dos custos totais da produção (NATH et al., 2008; CAMPOS et al., 2014).

2.2 *Burkholderia sacchari* LFM 101

Dentre várias linhagens de microrganismos produtores de PHA, a bactéria *Burkholderia sacchari* isolada do solo de canavial brasileiro se destaca por seu grande potencial industrial, contando com sua alta eficiência e facilidade de metabolizar várias fontes de carbono (SANT'ANA, 2013). Esta bactéria se destaca por seu rápido crescimento em sacarose, bem como o acúmulo de altas porcentagens de PHA no seu interior (GOMEZ et al., 1996, 1997; MENDONÇA, 2009).

B. sacchari LFM 101 (identificada também como IPT 101, LMG 19450 e CCT 6771) é uma bactéria gram-negativa de coloração branca, devido ao acúmulo de poli(3-hidroxi-butirato) P(3HB) e poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) P(3HB-co-3HV). Possui vários flagelos polares e sua forma é de bastonete, medindo 0,5 a 0,8 µm de largura e 1,5 a 3,0 de comprimento. (BRAMMER et al., 2001).

B. sacchari atinge eficiência em conversão de glicose em P(3HB) aproximadamente 80% da eficiência máxima teórica. Uma das vantagens é sua capacidade de hidrolisar sacarose e metabolizar outros açúcares, uma vez que também pode utilizar xilose como fonte única de carbono e até mesmo hidrolisados hemicelulósicos a partir de bagaço de cana-de-açúcar tornando o custo de produção mais atrativo (GOMEZ, et al., 1996; MENDONÇA et al., 2013; SILVA; GOMEZ, 2007).

2.3 Desenvolvimento de estratégias para produção de PHA

Tendo em vista que o PHA é considerado uma excelente alternativa para substituição dos plásticos sintéticos, muitas pesquisas têm sido realizadas,

visando reduzir seu custo de produção, a fim de torná-lo mais atrativo comercialmente. Estas pesquisas buscam o uso de substratos de baixo custo e/ou aumento da eficiência da produção de uma determinada linhagem (SANT'ANA, 2013).

Os custos associados às fontes de carbono têm sido considerados como um dos principais fatores limitantes para a produção e acúmulo de PHA, sendo responsável por até 50% dos custos totais de produção. Isto pode ser atribuído à utilização de fontes de carbono mais caras no processo produtivo. Considera-se que seria de grande valia a utilização de fontes de carbono renováveis, disponíveis no meio ambiente, principalmente pelo interesse econômico. Assim, glicerol, melão, soro de queijo, resíduos de biomassa agrícola e florestal têm sido considerados como fontes de carbono alternativas para produzir PHA, também propostas como estratégias destinadas a melhorar a sustentabilidade dos processos de produção de PHA (SILVA et al., 2014).

Vários trabalhos foram desenvolvidos para tornar a produção de PHA mais eficiente e aplicável a nível industrial. A título de exemplo, algumas abordagens estão sendo seguidas através da identificação e caracterização de linhagens puras de microrganismos produtores de PHA (GOMEZ et al., 1996; GOMEZ et al., 1997; SILVA et al., 2002; BRAMMER et al., 2002; LIMA; CRISI; BONATO, 1999) e o uso de bactérias recombinantes para aumentar o rendimento de PHA a partir de substratos de baixo custo (FONSECA; ANTONIO VASCONCELOS, 2007; BOSCO; CHIAMPO, 2010; CARDONA-SALAMANCA et al., 2014; CASTILHO; MITCHELL; FREIRE 2009; CAMARGO et al., 2011; FREIRE, 2012).

Neste sentido, destaca-se a que a maior estratégia para produção de PHA é descobrir fontes de carbono renováveis de baixo custo, tais como os resíduos agroindustriais, por possuírem elevada disponibilidade, contribuindo assim para minimizar os problemas ambientais.

2.4 Produções de PHA a partir do soro do leite

A utilização de resíduos orgânicos de baixo custo provenientes de indústrias processadoras de alimentos pode minimizar o alto custo de produção de PHA. Estes resíduos podem conter inúmeras substâncias de alto valor. Se for

empregada uma tecnologia adequada, estes materiais podem ser convertidos em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários (ZORTÉA, 2012).

O soro do leite é um resíduo da indústria alimentar que tem recebido grande atenção pela sua composição, sendo indicado para o processo biológico de produção de PHA, pois contém lactose, proteínas e gorduras como seus principais constituintes, que são úteis em diferentes maneiras em bioprocessos (BOSCO; CHIAMPO, 2010).

O soro de leite contém cerca de 4,5% de lactose, 0,8% de proteínas, 1% de sais e 0,1-0,8% de ácido láctico. Sabendo-se que a lactose é a principal fonte de carbono disponível em soro de queijo, a produção de PHA a partir desta matéria-prima deve ser baseada em estirpes de bactérias capazes de metabolizar esse dissacarídeo. A capacidade de crescer em lactose depende da hidrólise deste açúcar e do metabolismo da glicose e da galactose resultantes (FONSECA et al., 2008).

Vários autores demonstram a produção de PHA a partir do soro do leite. Koller et al. (2008) estudaram a produção de PHA a partir do uso do soro hidrolisado como complemento com outros açúcares glicose e galactose através do microrganismo *P. hydrogenovora*. Marangoni et al. (2002) utilizaram o soro hidrolisado como substrato principal, juntamente com o açúcar invertido, afim de avaliar sua influência na produção de P(3HB-co-3HV) a partir de *R. eutropha* DSM 545 recombinante. Wong e Lee (1998) estudaram a produção de P(3HB) utilizando o soro como seu principal substrato em culturas com células de *Escherichia coli* recombinante, obtendo 87 g.L⁻¹ de células e 69 g.L⁻¹ de P(3HB), perfazendo um total de 80% de polímero, com uma produtividade de 1,4 g.L⁻¹; Kim (2000) utilizou *E. coli* recombinante em soro do leite não concentrado, buscando controlar a biossíntese do polímero através da produção de células e acúmulo de P(3HB) acelerados, sem precisar remover o meio de cultura, através de cultivos com ou sem limitações de oxigênio, obteve 80-57% de P(3HB). Ahn et al. (2000) utilizaram diferentes estratégias de cultivo para produção de PHB através do soro do leite também por *E. coli* recombinante.

O estado do Mato Grosso do Sul ocupa o 12º lugar na produção nacional de leite (IBGE, 2012) com uma produção de 517 milhões e 185 mil litros de leite

no ano de 2012. Considerando-se que entre 85 e 95% do volume de leite é o soro de leite, há um enorme potencial de aproveitamento deste resíduo em diferentes aplicações, como a produção de biogás, etanol, proteína unicelular, concentrado proteico, além dos biopolímeros, entre outros produtos comercializados (HOSSEINI; SEYED; TOWFIGHI 2003).

2.5 Produção de biofilmes a base de gelatina, soro de leite e PHA

No ano de 2013 a indústria de transformação de plástico totalizou cerca de 6,76 milhões de toneladas de plásticos transformados. Em relação ao ano anterior, o faturamento da mesma aumentou aproximadamente 8,6%, totalizando 61,33 bilhões de reais, representando grande importância no mercado brasileiro (ABIPLAST, 2013).

Entretanto, o problema ambiental é um dos graves fatores ocasionados pelos uso de plásticos sintéticos, devido ao acúmulo no meio ambiente e sua alta resistência à decomposição biológica, conduzindo à alteração da biodiversidade (OTARI; GHOSH, 2009). Uma das soluções encontradas é o desenvolvimento de filmes a partir de biomateriais que possam substituir os materiais sintéticos. Dentre os materiais pesquisados, os biopolímeros naturais, como os polissacarídeos e as proteínas, se apresentam mais promissores, em razão de serem abundantes, renováveis, econômicos, e capazes de formar uma matriz contínua (MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 1999; GONTARD; GUILBERT, 1996).

Os bioplásticos/biopolímeros podem ser classificados como comestíveis ou biodegradáveis, simples ou compostos. Os biodegradáveis podem também ser elaborados utilizando-se materiais derivados de poliésteres bacterianos que possuam uma rápida degradação ou então por blends. Para a elaboração dos bioplásticos são necessários alguns componentes com finalidade específica, sendo os principais um biopolímero capaz de formar o filme e um plastificante (CUQ et al., 1997; FAKHOURI, 2009).

Os filmes geralmente são elaborados a partir de proteínas, polissacarídeos, lipídios ou da combinação deles (DAVANÇO; PALMU; GROSSO, 2007). As proteínas são macromoléculas biológicas compostas por monômeros denominados aminoácidos. Nos filmes biodegradáveis as proteínas

interagem intermolecularmente, através de formação de ligações de hidrogênio, pontes de sulfeto e ligações hidrofóbicas (SOUSA, 2012).

A incorporação de proteínas como a gelatina surge como alternativa viável economicamente para melhorar as propriedades de barreira dos biofilmes. Devido às suas propriedades funcionais, a mesma tem sido explorada em estudos envolvendo a formação de filmes comestíveis e/ou biodegradáveis. Filmes à base de proteínas apresentam efetiva barreira a gases (CO₂ e O₂), porém apresentam uma alta permeabilidade ao vapor de água (CARVALHO; GROSSO, 2006).

Cabe ressaltar que a gelatina tem sido utilizada com êxito para formação filmes, pois é transparente, flexível, resistente à água e impermeável ao oxigênio (CUQ et al., 1998). A gelatina é raramente usada sozinha, devido à sua baixa intensidade e alta fragilidade. Portanto, a gelatina é frequentemente utilizada após a modificação através de vários métodos, como a mistura a outros componentes. É importante ressaltar que a mistura é uma maneira eficaz e conveniente para melhorar o desempenho dos materiais poliméricos (THU; NG, 2013).

A elaboração dos filmes é realizada através da combinação de solventes, como água, etanol ou combinação de ambos com adição de proteínas (gelatina, glutén, queratina, proteína do soro) ou polímeros naturais como amido (FAKHOURI, 2009). Um aspecto determinante na elaboração de filmes é a solubilidade de proteínas e a capacidade das mesmas de interagir com o solvente utilizado, uma vez que a solubilidade total da proteína é necessária para o processo de formação destes filmes (SGARBIERI, 1996; FAKHOURI, 2009).

O soro do leite pode ser considerado um grande solvente, tendo em vista que 85 e 95% de todo o leite é o soro, o qual contém, após separação da caseína, 55% dos nutrientes do leite. Dentre estes nutrientes pode ser destacada a lactose 4,8%; as proteínas solúveis (globulina e albumina) 0,75%; lipídeos 0,5%; e sais minerais 8 a 10% (KROLOW, 2013). Entre as proteínas que podem ser utilizadas no campo de embalagem, especialmente para alimentos sensíveis à água e permeação de gases, soro de leite é um dos mais promissores (SHIMID et al., 2012).

2.6 Referências

ABIPLAST, Associação Brasileira da Indústria de Plástico; Relatório de desempenho anual, 2013.

AHN, W.S; PARK, S.J; LEE, S.Y. Production of poly(3-Hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 8, p. 3624-3627, 2000.

BOSCO, F; CHIAMPO, F. Production of polyhydroxyalcanoates (PHAs) using milk whey and dairy wastewater activated sludge production of bioplastics using dairy residues. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 109, n. 4, p. 418–421, 2010.

BRAMMER, C. O; SILVA, L. F; GOMEZ, J. G. CPRIEFERT; H; STEINBUCHEL, A. Identification of the 2-methylcitrate pathway involved in the catabolism of propionate in the polyhydroxyalkanoate- producing strain *Burkholderia sacchari* IPT101 and analysis of a mutant accumulating a copolyester with higher 3-hydroxyvalerate content. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 1, p. 271–279, 2002.

BRAMMER, C.O; VANDAMME, P; SILVA, L.F; GOMEZ, J.G.C; STEINBUCHEL, A. *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, p.1709–1713, 2001.

CAMARGO, A.F; INNOCENTINI-MEI, H.L; LEMES, P.A; MORAES, S.G; DURÁN, N. Processing and characterization of composites of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and lignin from sugar cane bagasse. *Journal of Composite Materials*, p. 1-9, 2012.

CAMPOS, M.I; FIGUEIREDO, T.V.B; SOUSA, L.S; DRUZIAN, J.I. The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by

Cupriavidus necator using a response surface methodology and its characterizations. *Industrial Crops and Products*, v. 5, p. 338– 346,2014.

CARDONA-SALAMANCA, L; ASHE, C; STIPANOVIC, A.J; NOMURA, C.T. Enhanced production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from beechwood xylan by recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, p.831–842, 2014.

CARVALHO, R.A; GROSSO, C.R.F. Efeito do tratamento térmico e enzimático nas propriedades de filmes de gelatina. *Ciência e Tecnologia Alimentos*, v. 26, p. 495-501, 2006.

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

CUQ, B., GONTARD, N., GUILBERT, S. Thermoplastic properties of fishmyofibrillar proteins: application to biopackaging fabrication. *Polymer*, v 38, p. 4071- 4078, 1997.

CUQ, B; GONTARD, N; GUIBERTH, S. Proteins as agricultural polymers for packaging production. *American Association of Cereal Chemists*, v. 75, n. 1, 1998.

DAVANÇO, T; TANADA-PALMU, P; GROSSO, C. Filmes compostos de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou capróico: efeito do pH e da adição de surfactantes sobre a funcionalidade dos filmes. *Ciência e Tecnologia Alimentos*, v 2, p 408-416, 2007.

FAKHOURI, F. M. Bioplásticos flexíveis e biodegradáveis à base de amido e gelatina. 2009. 249p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

FONSECA, G.G; SILVA, L.F; GOMEZ, J.G.C. Biodegradable polyesters from cheese whey. *Advances in Cheese Whey Utilization*. p. 123-145, 2008.

FRADINHO, J.C; OEHMEN, A; REIS, M.AM. Photosynthetic mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from individual and mixed volatile fatty acids (VFAs): Substrate preferences and co-substrate uptake. *Journal of Biotechnology*, v.185, p. 19–27, 2014.

FREIRE, R.K.B. Construção de bactérias recombinantes para produzir etanol e biopolímeros a partir de açúcares derivados de hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar. *Dissertação (Mestrado Microbiologia)- Instituto de Ciências Biomédicas, USP, 2012.*

GOMEZ, J.G.C.; RODRIGUES, M.F.A.; ALLI, R.C.P.; TORRES, B.B.; BUENO NETTO, C.L., OLIVEIRA, M.S.; SILVA, L.F. Evaluation of soil Gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 45, p. 785-791, 1996.

GOMEZ, J.G.C; FONTOLAN, V; ALLI, R.C.P; RODRIGUES, M.F.A; BUENO NETTO, C.L; SILVA, L.F; SIMÕES, D.A. Production fo poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (P3HB-co-3HV) by soil isolated bacteria able to use sucrose.

GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-packaging: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. *Boletim do SBCTA*, v.30, n.1, p.3-15, 1996.

HOSSEINI, M; SEYED, A. S; TOWFIGHI, J. Application of a bubble-column reactor for the production of a single-cell protein from cheese whey. *Ind. Eng. Chem.* v. 42. p. 764-766, 2003.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. Indicadores IBGE-Estatística da Produção Pecuária, 2012.

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

KOLLER, M; BONA, R; CHIELLINI, E; FERNANDES, E.G; HORVAT, P; KUTSCHERA, C; HESSE, P; BRAUNEGG, G. Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. *Bioresource Technology*, v. 99, p.4854–4863, 2008.

KROLOW, A.C. Soro de queijo, alimento nutritivo e funcional. Pesquisadora da Embrapa Clima Temperado, 2013.

LEE, S. Y Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol Bioeng*. v.5, n.49, p.1-14, 1996.

LIMA, T.C.S; CRISI, B.M; BONATO, M.C.M. Bacteria isolated from a sugarcane Agroecosystem: Their potential production of Polyhydroxyalkanoates and resistance to antibiotics. *Revista de Microbiologia*, v. 30, p. 214-224, 1999.

LOPES, G.C.S. Produção de plásticos biodegradáveis utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Instituto de Ciências Biomédicas, USP, 2010.

LUIZETTO, J. D Cultivo da bactéria *Bacillus megaterium* para produção do biopolímero poli(3-hidroxibutirato) e modelagem matemática do bioprocesso. Dissertação (Mestrado Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química, FURG, 2000.

MARAGONI, C; FURIGO, A; ARAGÃO, G.M.F Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and

inverted sugar with propionic acid feeding. *Process Biochemistry*, v.38, p.137-141, 2002.

MENDONÇA, T.T Avaliação potencial de *Burkholderia sacchari* produzir o copolímero biodegradável poli(3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-alcanoato) [P(3HB-co-3HHX)]. 130f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Instituto de Ciências Biomédicas, USP, 2009.

MENDONÇA, T.T; GOMEZ, J.G.C.; BUFFONI, E; SANCHEZ RODRIGUEZ, R.J.; SCHRIPSEMA, J; LOPES, M.S.G; SILVA, L.F. Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, v.116, p.815—829, 2013.

MONTERREY-QUINTERO, E.S; SOBRAL, P.J.A. Preparo e caracterização de proteínas miofibrilares de Tilápia-do-Nilo para elaboração de biofilmes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, n.1, p.179-189, 2000.

NATH, A; DIXIT, M; BANDIYA, S; CHAVDA; DESAI, A.J. Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. *Bioresource Technology*, v 99, p.5749–5755, 2008.

OTARI, S.V; GHOSH, J.S. Production and characterization of the polymer polyhydroxybutyrate-copolyhydroxyvalerate by *Bacillus megaterium* NCIM 2475, *Journal of Biological Sciences*. v.2, p.23-26, 2009.

SANT'ANA, D.V.P. Análise de fluxos metabólicos aplicada à biossíntese do polímero biodegradável poli-3-hidroxi-butarato P(3HB) por *Burkholderia sacchari*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Instituto de Ciências Biomédicas, USP, 2013.

SGARBIERI, V. Proteínas em alimentos proteicos. São Paulo, Ed. Varela, 1996.

SHIMID, M; DALLMANN, K; BUGNICOURT, E; CORDONI, D; WILD, F; LAZZERI, A; NOLLER, K. Properties of whey-protein-coated films and laminates as novel recyclable food packaging materials with excellent barrier properties. *International Journal of Polymer Science*, 2012.

SILVA, L. F., TACIRO, M. K., MICHELIN, M. E., CARTER, J. M., PRADELLA, J. G. C., GOMEZ, J. G. C. Process development for poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production for sugar cane bagasse hidrolysate, *International Symposium on Biological Polyesters*, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Germany, 2002.

SILVA, L.F; GOMEZ, J.G.C. Produção biotecnológica de polihidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. *Química Nova*, v. 30, n. 7, p.1732-1743, 2007.

SILVA, L.F; TACIRO, M.K; RAICHER, G; PICCOLI, R.A.M; MENDONÇA, T.T; LOPES, M.S.G; GOMEZ, J.G.C. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorefineries associated with the production of sugar and ethanol. *International Journal of Biological Macromolecules*, p. 6, 2014.

SOUZA, G.M. Desenvolvimento de filmes biodegradáveis ativos e aplicação na conservação de massa alimentícia fresca. *Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos)*, Universidade Federal da Goiás, UFG, 2012.

THU, E.H; NG, S.F. Gelatine enhances drug dispersion in alginate bilayer film via the formation of crystalline microaggregates. *International Journal of Pharmaceutics* v.454, p 99– 106, 2013.

WONG, H.H; LEE, S.Y. Poly(3-hydroxybutyrate) productions from whey by high-density cultivation for recombinant *Escherichia coli*. *Microbiology and Biotchechnology*. v.50, p.30-33, 1998.

ZORTEA, M.E.B. Estratégias de cultivo utilizando resíduos das indústrias processadoras de Alimentos e óleo de soja para produção de Poli(3-hidroxitirato). Dissertação (Mestrado Engenharia Química), Centro de Engenharias e Ciências Exatas, UNIOESTE, 2012.

3 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Desenvolvimento de filmes a partir de polihidroxialcanoatos produzidos por *Burkholderia sacchari* LFM 101 e hidrocoloides e soro de leite

RESUMO: Os polihidroxialcanoatos (PHA) são um grupo de poliésteres acumulados sob a forma de grânulos intracelulares por inúmeras bactérias, como reserva de carbono e energia. Apesar do interesse industrial, os custos de produção são considerados um grande problema para sua utilização em larga escala, uma vez que o substrato é um dos principais fatores para o aumento do custo do produto final. Considerando que o substrato utilizado influencia na estrutura do polímero e conseqüentemente suas características de flexibilidade e elasticidade. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a fisiologia *Burkholderia sacchari* LFM 101, em parâmetros cinéticos, usando a glicose como fonte de carbono e o soro de leite como co-substrato, nas temperaturas de 30 e 35°C, a fim de selecionar aquela condição com melhor rendimento em polímero, visando o desenvolvimento de filmes *multilayer*. Através dos ensaios realizados com a *B. sacchari*, observou-se que os cultivos utilizando glicose como única fonte de carbono a 35°C alcançou melhores resultados de parâmetros cinéticos e rendimento em polímero em relação aos outros ensaios, selecionando esta condição para produção de filmes. Os filmes *multilayer* foram desenvolvidos com gelatina em duas concentrações, soro de leite e P3HB, notou-se que com a adição de gelatina e soro de leite aos filmes deram aos mesmos melhores propriedades perante ao padrão PHA. Pelos resultados das análises físico-químicas, térmicas, mecânicas o filme com maiores concentrações de gelatina obteve melhores resultados. No entanto, a escolha do melhor filme irá depender de sua aplicabilidade.

Palavra-chave: Biofilmes, soro de leite, PHA.

3.1 Introdução

O uso de materiais plásticos é cada vez mais frequente, em decorrência às suas características mecânicas, durabilidade e seu baixo custo. Entre os diversos polímeros de uso da sociedade atual, os plásticos sintéticos têm sido mais utilizados (SANT'ANA, 2013).

Materiais descartáveis e embalagens, que representam um terço total da produção, causam o maior impacto ambiental devido à dificuldade de descarte. Mais de 90% do material dos aterros sanitários consiste da família dos plásticos sintéticos (ATLAS; BARTHA, 2007; LOPES, 2010).

Além disso, há uma demanda social e ambiental pela substituição desses materiais por outros mais adequados ao meio ambiente, principalmente por materiais biodegradáveis, considerados como bioplásticos (LOPES, 2010).

Muitos plásticos biodegradáveis estão disponíveis no mercado, entre eles os polihidroxicanoatos (PHA). Os PHA são poliésteres acumulados por bactérias, como reserva de carbono e energia, na forma de grânulos intracelulares, podendo utilizar como fonte de carbono substratos de baixo custo (RODRIGUEZ, 2012). São 100% biodegradáveis, possuindo propriedades semelhantes a vários termoplásticos sintéticos como o polietileno e polipropileno, tendo uma ampla gama de aplicações (MICHEL et al., 2012). A biodegradabilidade e biocompatibilidade são importantes características dos PHA (DU, 2012).

Yohannes et al. (2011) consideram que os biopolímeros são distinguidos de acordo com as suas estruturas químicas e suas funções. A compreensão do seu comportamento físico-químico e a sua resposta a estímulos externos é importante, a fim de melhorar a sua funcionalidade.

Além dos PHA existem outros tipos de biopolímeros biodegradáveis, os mais usados são feitos de proteínas (gelatina, caseína, ovoalbumina, glúten de trigo, zeína e proteínas miofibrilares), polissacarídeos (amido e seus derivados, pectina, celulose e seus derivados, alginato e carragena) e os lipídios (monoglicérides acetilados, ácido esteárico, ceras e ésteres de ácido graxo) ou a combinação dos mesmos (CUQ; GONTARD; GUILBERT, 1995).

Estes biopolímeros podem ser comestíveis ou biodegradáveis, isso irá depender da sua aplicabilidade. O uso da gelatina como um biopolímero é

extremamente interessante pelo fato da mesma ser produzida em abundância no Brasil, e possuir um baixo custo comercial, com propriedades funcionais adequadas para produção de biofilmes (CARVALHO, 1997; D'AVILLA, 2010).

A gelatina é obtida por desnaturação térmica ou físico-química da degradação do colágeno, podendo ser utilizada em conjunto com outros componentes (FAKHOURI et al, 2009). A escolha do plastificante e do solvente a ser utilizado para formação dos filmes devem garantir compatibilidade com o polímero (FAKHOURI, 2013).

O soro de leite pode ser considerado um grande componente para produção de filmes, pois é rico em nutrientes, e por ser um considerado resíduo da indústria de laticínios ainda é pouco aproveitado setor tecnológico alimentício, representando ainda um grande desperdício nutricional e financeiro, sendo grandes volumes enviados para nutrição de suínos, ou direcionados a sistemas de tratamento de efluentes com baixa eficiência ou altos custos (SERPA; PRIAMO; REGINATTO, 2009).

Neste sentido, a formação de filmes com a junção da gelatina, soro de leite e PHA pode ser uma alternativa viável para a diminuição dos impactos ambientais causados pelo resíduo soro de queijo e o acúmulo de plásticos sintéticos. Sendo assim, este estudo teve por objetivo avaliar a fisiologia a fisiologia *Burkholderia sacchari* LFM 101, em parâmetros cinéticos, usando a glicose como fonte de carbono e o soro de queijo como co-substrato, nas temperaturas de 30 e 35°C, selecionar o melhor rendimento em polímero, visando o desenvolvimento de filmes *multilayer* compostos à base de gelatina nas concentrações de 3 e 5%, soro queijo e PHA, no sentido de caracterizá-los para observar a influência do soro de queijo *in natura* e do PHA nas suas propriedades mecânicas, de barreira à água, térmicas e estruturais do filme.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Meios e condições de cultivo

Para este estudo foi utilizado *Burkholderia sacchari* LFM 101 cedida pelo Laboratório de Bioprodutos, ICB (Instituto de Ciências Biomédicas- USP). O micro-organismo foi cultivado durante 24 horas (30°C, 250 rpm) em caldo nutriente (CN; 3 g.L⁻¹ de extrato de carne, 5 g.L⁻¹ de peptona) para obtenção de

crescimento e manutenção celular (ROCHA et al., 2008). Para realização dos cultivos utilizou-se meio mineral (MM) definido (LEE; CHOI, 2001), apresentando a seguinte composição: KH_2PO_4 (6,67 g.L⁻¹); $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (4 g.L⁻¹); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,8 g.L⁻¹); ácido cítrico (0,8 g.L⁻¹); tiamina (0,025 g.L⁻¹); e elementos traço (0,5 g.L⁻¹). A solução de elemento traço foi preparada com $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 g.L⁻¹); CaCl_2 (2 g.L⁻¹); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,2 g.L⁻¹); $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g.L⁻¹); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1,0 g.L⁻¹); $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g.L⁻¹); $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (0,02 g.L⁻¹). As fontes de carbono utilizadas foram glicose (10 g.L⁻¹), lactose (5 g.L⁻¹) e soro de queijo *in natura*, preparado em processo de pasteurização lenta, deixando em agitação constante durante 30 min. a 65°C, seguido de resfriamento à 5°C.

O preparo do inóculo para o pré-cultivo consistiu em transferir uma colônia da cepa de uma placa de Petri para um frasco Erlenmeyer de 500 mL, contendo 250 mL de meio mineral adicionado da fonte de carbono. Os pré-cultivos foram realizados em incubador rotativo (30°C e 35°C, 250 rpm). Os cultivos principais foram realizados em duplicada em condições idênticas aos pré-cultivos, a partir de uma alíquota do inóculo calculada de 0,1 medida por densidade óptica (D.O.) ($\lambda = 600\text{nm}$).

3.2.2 Métodos analíticos

3.2.2.1 Densidade óptica

A densidade óptica foi obtida utilizando-se espectrofotômetro UV-Vis ($\lambda = 600\text{ nm}$) com amostragens realizadas em intervalos de 1 h, nas diluições necessárias. A fase exponencial de crescimento foi identificada como a região linear da plotagem do $\ln(\text{D.O.})$ versus tempo para os dados de cultivo.

3.2.2.2 Determinação de massa celular seca (MCS)

A concentração de massa celular seca foi medida por gravimetria a partir de uma alíquota do meio de cultivo submetido à centrifugação (15.000 rpm, 15 min., 10°C) descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi seco em estufa a 50°C até peso constante.

3.2.2.3 Análise de cromatografia líquida de alta eficiência

As concentrações e o consumo de glicose e lactose no decorrer das cinéticas foram analisados através de cromatografia líquida de alta eficiência

(HPLC- Agilent Technologies 1290). Foi utilizada uma coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H (300 × 7,8 mm; Bio-Rad, Hercules, EUA). Os compostos foram eluídos a 55°C, empregando-se água ultra pura pelo sistema Mili-Q (Sistema Direct-Q3) contendo ácido trifluoroacético (TFA) a 0,005 M como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL/min. Estes compostos foram detectados por absorvância UV a 254 nm conectado em série com um detector refratômetro diferencial Agilent 1260 (RID) (FONSECA, 2007).

3.2.2.4 Determinação quantitativa por cromatografia gasosa

Cerca de 10 a 15 mg de células liofilizadas foram submetidas à propanólise em tubo ao qual foram adicionados: 2 mL de solução de HCL em propanol (1:4 v/v), 2,1 mL de dicloroetano e 100 µL de uma solução de ácido benzoico (40 g/L) em propanol (RIIS; MAI, 1988). Os tubos foram fechados firmemente e homogeneizados vigorosamente antes de colocar a mistura em um banho (100°C por 3 horas). Depois de decorridos os primeiros 30 minutos os tubos foram retirados e agitados, voltando ao banho e deixando até o tempo final. Ao final do tempo de incubação, os tubos foram resfriados e, adicionou-se 4 mL de água destilada, agitando-se e deixando em repouso até haver separação de fases aquosa e orgânica, que contêm os propil-ésteres.

A fase aquosa foi retirada com auxílio de uma pipeta e vácuo e, na mistura restante, foi adicionado sulfato de sódio anidro para absorção de água remanescente na fase contendo propil-ésteres. Feito isso, o restante foi transferido para frascos apropriado e analisado em cromatógrafo. Um volume de 1 µL da fase orgânica foi analisado após fracionamento da amostra em cromatógrafo gasoso HP6890 Series GC System equipado com a coluna HP-5(5% de fenil-metil-siloxane, comprimento de 30m, diâmetro de 0,25 mm, espessura do filme 0,24 µm). A análise foi conduzida nas condições: gás de arraste Hélio (0,8 mL/min); a temperatura do injetor foi de 250°C; e a temperatura do detector foi de 300°C, foi utilizado o sistema de detecção de ionização de chama (FID); a temperatura do forno foi e 100 °C por 1 minuto, elevação de temperatura de até 185°C a 8°C/min e 185°C por 15 minutos. O Acido benzóico foi utilizado com padrão interno.

3.2.2.5 Extração de PHA

As células foram centrifugadas (10.000 rpm, 40 min.) e secas em estufa durante 24 horas a 50°C. Os PHA foram extraídos com clorofórmio das células secas, usando-se um extrator Soxhlet. Após um período de refluxo de 12h, a solução de clorofórmio foi concentrada com um evaporador giratório e o polímero precipitado e purificado pela adição de álcool etílico p.a., sob agitação, e posteriormente seco em estufa (24h, 35°C). Posteriormente o PHA foi diluído em clorofórmio (proporção de 0,8 g de PHA para 60 mL de CHCl₃) e então seco, vertendo-se 15 mL por placas de Petri de 10 cm de diâmetro.

3.2.3 Cálculo dos parâmetros cinéticos

3.2.3.1 Velocidade específica de crescimento celular (μ_{max})

A velocidade específica de crescimento foi definida como:

$$\ln X = \mu_x \cdot t \quad \text{Equação (1)}$$

Através do gráfico $\ln(x)$ em função do tempo (t) obteve-se o coeficiente angular da reta ajustada aos dados experimentais na fase exponencial de crescimento, correspondente ao valor de μ_{max} .

3.2.3.2 Produtividade máxima em célula (P_{max})

A produtividade máxima em célula (P_{max}) foi definida como:

$$P_{max} = \frac{X - X_0}{t} \quad \text{Equação (2)}$$

onde X (g.L⁻¹) é a concentração celular final e X_0 (g.L⁻¹) a concentração celular inicial do cultivo, em relação ao tempo (t).

3.2.3.3 Concentração máxima da biomassa (X_{max})

A concentração máxima da biomassa (X_{max}) foi obtida através curva de calibração, correlacionando a absorvância e a massa celular seca, obtendo-se assim um fator de conversão de DO em concentração celular.

3.2.3.4 Velocidade específica de consumo de substrato (μ_s)

A velocidade específica de consumo de substrato (μ_s) foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\mu_s = \frac{\mu_{\max}}{Y_{X/S}} \quad \text{Equação (3)}$$

onde μ_{\max} = velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1}); X = concentração celular (g MCS.L^{-1}); μ_s = velocidade específica de consumo de substrato (g.(g MCS h)^{-1}); S = concentração de substrato (g.L^{-1}); $Y_{X/S}$ = fator de conversão de substrato a células (g MCS.g^{-1}).

3.2.3.5 Fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$)

O fator de conversão de substrato em célula foi definido como:

$$Y_{X/S} = \frac{X_{\max} - X_0}{S_0 - S_{\max}} \quad \text{Equação (4)}$$

onde X_{\max} e S_{\max} representam a concentração de biomassa e a concentração de substrato, respectivamente, no ponto onde a derivada da função polinomial de X em relação a t (dX/dt), ajustada aos pontos experimentais é igual a zero e X_0 e S_0 representam a concentração de biomassa e a concentração de substrato, respectivamente no tempo zero.

3.2.4 Elaboração de filmes multilayer

Para a produção dos filmes *multilayer* foram utilizados gelatina, soro do queijo *in natura*, glicerol e polihidroxialcanoatos (PHA). A elaboração da solução filmogênica de gelatina e soro foi obtida pela modificação do método descrito por Fakhouri, 2009. Foi produzido um filme apenas de gelatina e gelatina de soro nas proporções de 5 e 3g que foi considerado o branco das amostras de filmes derivados soro de queijo e PHA.

Após a secagem, todos os filmes obitos foram condicionados a 25°C e 52% UR durante 48 h antes do início das análises. Foi separado um filme de PHA para utilizar como branco para as amostras derivadas dos mesmos.

3.2.5 Características do filme

3.2.5.1 Aspecto visual

Foram realizadas análises visuais e táteis, com intuito de se aproveitar somente os filmes homogêneos (coloração uniforme e ausência de bolhas e

partículas insolúveis de gelatina) e flexíveis (facilidade de manuseio, ausência de rupturas ou zonas quebradiças).

3.2.5.2 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada com a utilização de um micrômetro Mitutoyo Digimatic Co. Proof, representando a média aritmética dos valores de 5 medidas tomadas aleatoriamente em diferentes partes dos mesmos.

3.2.5.3 Opacidade

A opacidade dos filmes foi determinada utilizando-se um colorímetro Modelo CR-400 (Konica Minolta, Croma Meter, Japão). As determinações foram realizadas em quadruplicata após a calibração do colorímetro com um fundo padrão branco e um fundo padrão negro. A opacidade foi determinada pela Equação 5, demonstrada por Hunterlab:

$$Op = \left(\frac{Op_N}{Op_B} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação (5)}$$

Onde: Op = opacidade do filme (%);

Op_N = opacidade do filme sobreposto a um fundo negro;

Op_B = opacidade do filme sobreposto a um fundo branco

3.2.5.4 Análise de cor

A coloração dos filmes foi determinada utilizando-se um colorímetro Modelo CR-400 (Konica Minolta, Croma Meter, Japão). As determinações foram realizadas em quadruplicata após a calibração do colorímetro com um fundo padrão branco. A coloração foi determinada pela Equação (6), demonstrada também por Hunterlab (1997).

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{Equação (6)}$$

3.2.6 Propriedades físico-químicas

3.2.6.1 Solubilidade em água

A solubilidade em água dos filmes foi determinada segundo o método proposto por Gontard et al. (1994). As amostras, em triplicata, foram preparadas recortando-se discos de 2 cm de diâmetro. A massa seca inicial das amostras foi obtida após secagem das mesmas, por um período de 24 h a 105°C, em estufa de circulação e renovação de ar. Após a primeira pesagem, as amostras foram imersas em um recipiente contendo 50 mL de água destilada e agitadas suavemente por 24 h. Em seguida, as amostras solubilizadas foram retiradas da água e secas à temperatura de 105°C por mais 24 horas, para a obtenção da massa seca final.

3.2.6.2 Solubilidade em ácido

A solubilidade em ácido foi determinada preparando-se as amostras da mesma maneira que para o cálculo da solubilidade em água; porém, após a obtenção da massa seca, estas foram submersas num recipiente contendo solução 1 N de ácido clorídrico por 24 h. Após esse período, as amostras foram secas e pesadas para obtenção da massa final.

3.2.7 Propriedades de barreira

3.2.7.1 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi determinada pelo método padrão E-96 modificado da ASTM (1998). Os filmes foram selados a fim de garantir que toda a permeação de umidade ocorresse somente através do mesmo, em seguida os mesmos foram inseridos em células de permeação contendo cloreto de cálcio e acondicionados em cápsulas de acrílico que mantiveram a temperatura de 25°C e 75% UR. O vapor de água transferido através do filme foi determinado pelo ganho de massa do cloreto de cálcio, medido a cada 1 h (o resultado final é multiplicado por 24, para se obter o valor corresponde a dia). O efeito do espaço de ar, como descrito por McHugh e Krochta (1994) e Gennadios et al. (1993), entre a região abaixo do filme e a superfície do cloreto de cálcio nas células-teste, não foi considerado para o

cálculo da taxa de transmissão de vapor de água. Os testes foram realizados em triplicata.

3.2.8 Propriedades mecânicas

3.2.8.1 Resistência à tração e alongação

A resistência à tração e a porcentagem de alongação na ruptura foram determinadas utilizando um texturômetro TA-XT2 *Texture Analyser* (SMS, Surrey, UK), operado de acordo com o método padrão *ASTM D 882-83* [14], com separação inicial das garras e velocidade do teste de 50 mm e 1 mm/s, respectivamente. Os filmes foram recortados em retângulos de 8,0 de comprimento e 2,54 cm de largura. A resistência à tração foi calculada dividindo-se a força máxima pela área seccional do filme (largura do filme x espessura). Dividindo-se os valores de extensão pela separação inicial das garras (50 mm) e multiplicando-se por 100, foi obtida a porcentagem de alongação na ruptura.

3.2.8.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia da superfície dos filmes foi observada utilizando-se um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), modelo Leo 440i, marca LEO operado a 10 kV e 50 mA. Antes dos testes as amostras foram cobertas com uma fina camada de ouro para a condução térmica.

3.2.8.3 Difratometria de raios-X

Os difratogramas foram obtidos utilizando-se um difratômetro de Raios-X, modelo X'Pert, marca Philips. As condições de análise foram: (i) voltagem e corrente: 40 kV e 40 mA, respectivamente; (ii) faixa de varredura: 2θ de 5 a 30°; (iii) passo: 0,1° e (iv) velocidade 1°/min, dotado de monocromador de feixe secundário de grafite. A variação dos tamanhos dos cristais foi determinada utilizando-se o PC APD Diffraction Software. As amostras foram armazenadas a 25°C temperatura ambiente e 50% de UR, e analisadas em triplicata.

3.2.9 Propriedades térmicas

3.2.9.1 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As determinações das temperaturas de transição vítrea e das variações da entalpia de fusão dos filmes foram realizadas por análises de calorimetria diferencial de varredura, utilizando-se um calorímetro da TA Instruments (EUA), modelo TA 2010, com módulo de resfriamento por nitrogênio líquido. As amostras foram preparadas e pré-condicionadas à temperatura de 25°C e com umidade relativa controlada de 50%. As medidas foram realizadas em atmosfera inerte de nitrogênio gasoso ultra-seco, de grau cromatográfico, a uma mesma vazão de alimentação e de arraste de 50 cm³/min. Os ensaios iniciaram-se a uma temperatura de 30°C e, a partir desta, as amostras foram aquecidas a uma taxa de 10°C/min até atingir a temperatura final de 140°C. O material-referência para esta análise foi o ar atmosférico.

3.2.10 Análise estatística

O programa Statistica® 5.5 (Stasoft, USA) foi utilizado para calcular as análises de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi usado para determinar diferenças entre as propriedades dos filmes no intervalo de 95% de confiança.

3.3 Resultados e discussão

3.3.2 Análise dos parâmetros cinéticos *B. sacchari* LFM 101 em diferentes temperaturas e substratos

A principal característica da *B. sacchari* LFM 101 é seu grande potencial em acumular PHA a partir de vários substratos, principalmente glicose e sacarose. Avaliou-se seu metabolismo através de parâmetros cinéticos para analisar seu desempenho e rendimento em polímero, com ênfase na produção de biofilmes. O microrganismo foi cultivado em sais minerais contendo glicose (10 g.L⁻¹). O soro do leite *in natura* e a lactose foram analisados como co-substratos, os cultivos com o soro de leite foi utilizado 10% do volume final do inóculo (25 mL) e com a lactose foi realizado com cultivos em 5 (g.L⁻¹).

A análise dos parâmetros cinéticos obteve como melhor resultado comparando os μ_{\max} (h⁻¹) o cultivo a 35°C utilizando glicose como única fonte de carbono. Este resultado se assemelha àquele observado por Brammer et al. (2001), que destacam o intervalo de 28 a 30°C como ideal para o crescimento

desta bactéria, apesar de observarem um bom crescimento desta também a 37°C. (Tabela 1).

Os valores alcançados pela velocidade de crescimento específico em glicose a 30 e 35°C foram 0,473 e 0,577 h⁻¹ respectivamente. Estes resultados vêm ao encontro daqueles obtidos previamente por Gomez (1996), onde a *B. sacchari* foi capaz de crescer com velocidade específica de crescimento na faixa de 0,4 – 0,45 h⁻¹, sendo destacado o seu grande potencial, principalmente pela alta eficiência de conversão de glicose em P(3HB).

Tabela 1. Parâmetros cinéticos de cultivo de *B. sacchari* LFM 101 em meio mineral com glicose, soro de leite e glicose/lactose.

Subs.	T (°C)	μ_{\max} (h ⁻¹)	TD (h)	X_{\max} (g.L ⁻¹)	P_{\max} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	μ_s (g.L ⁻¹)	$Y_{X/S}$
GLC	30	0,473 ^b ±0,009	1,466 ^b ±0,027	3,49 ^{a,b} ±0,250	0,180 ^a ±0,013	1,019 ^a ±0,009	0,511 ^a ±0,02
	35	0,577 ^a ±0,019	1,202 ^c ±0,040	3,81 ^a ±0,209	0,188 ^a ±0,010	1,424 ^b ±0,123	0,413 ^a ±0,04
GLC/ SORO	30	0,317 ^c ±0,050	2,21 ^a ±0,348	2,14 ^b ±0,291	0,149 ^{b,c} ±0,025	0,474 ^c ±0,030	0,335 ^b ±0,04
	35	0,387 ^b ±0,012	1,792 ^b ±0,057	1,45 ^b ±0,026	0,104 ^c ±0,000	0,491 ^c ±0,089	0,322 ^b ±0,07
GLC/ LAC	30	0,455 ^b ±0,014	1,52 ^b ±0,047	4,24 ^{a,b} ±0,223	0,209 ^a ±0,012	1,181 ^{a,b} ±0,03	0,446 ^a ±0,03
	35	0,479 ^b ±0,031	1,451 ^b ±0,094	3,836 ^b ±0,274	0,189 ^{a,b} ±0,014	1,495 ^a ±0,154	0,360 ^a ±0,04

Legenda: Subs.: substrato; GLC: glicose; SORO: soro de leite; LAC: lactose; T: Temperatura (°C); μ_{\max} (h⁻¹): Velocidade específica máxima de crescimento; TD (h): Tempo de duplicação; X_{\max} (g.L⁻¹): Concentração máxima da biomassa; P_{\max} (g.L⁻¹.h⁻¹): Produtividade máxima em células; μ_s (g.L⁻¹): Velocidade específica de consumo de substrato; $Y_{X/S}$: fator de conversão de substrato em células.

Os cultivos realizados com soro de leite atingiram uma velocidade específica de crescimento baixa comparada a glicose (0,317 e 0,387 h⁻¹, a 30°C e 35°C, respectivamente). Squio e Aragão (2004) destacam que a velocidade específica de crescimento com soro de leite em outras bactérias pode chegar a 0,23 h⁻¹, estando próximo ao valor obtido através das análises realizadas.

No entanto, os cultivos contendo lactose como co-substrato nas temperaturas 30°C e 35°C tiveram uma velocidade específica de crescimento de (0,455 e 0,479 h⁻¹) tendo um resultado próximo ao cultivo utilizando glicose com única fonte de carbono. Neste sentido, pode-se notar que a lactose não inibiu o crescimento do microrganismo, fazendo com que o mesmo consumisse totalmente glicose contida no meio.

O crescimento celular (g.L^{-1}) e o consumo do substrato de *B. sacchari* LFM 101 para os cultivos em glicose são apresentados na Figura 1, avaliados em termos de densidade óptica. De forma análoga, a Figura 2 apresenta os resultados dos cultivos utilizando o soro de leite como co-substrato, e a Figura 3 apresenta os resultados obtidos pelo cultivo em lactose também como co-substrato.

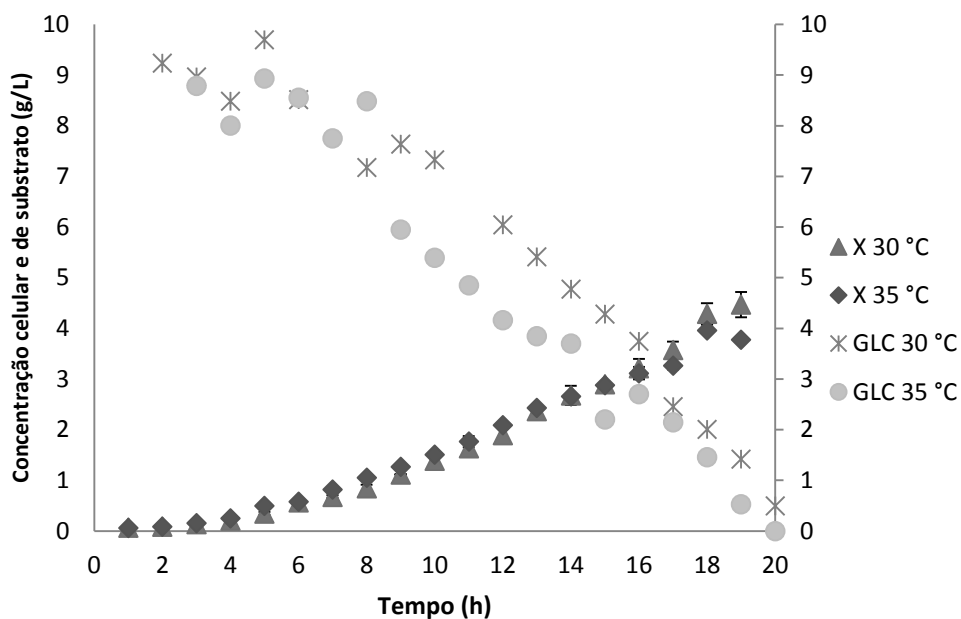


Figura 1. Cinéticas de crescimento, consumo de substrato de *Burkholderia sacchari* LFM 101 para cultivos a 30°C e 35°C com glicose. Onde: X 30 e 35°C correspondem ao crescimento cinético; GLC 30 e 35°C representam o consumo do substrato em glicose.

Observa-se pelos perfis apresentados na Figura 1, que as cinéticas de crescimento em glicose são semelhantes em termos de duração, sendo que ambas entraram na fase exponencial a partir de 3 h de cultivo. A fase exponencial dos cultivos teve um pequeno deslocamento pelo gráfico em relação a 30°C, indicando que a temperatura não influenciou totalmente o crescimento da bactéria, pode-se perceber também que o consumo de substrato teve um pequeno deslocamento a 35°C, mostrando também não houve tanta influência sobre o consumo do açúcar, conforme se observa pelos valores da figura.

Durante o crescimento cinético da *B. sacchari* utilizando soro de leite como co-substrato, nota-se que em nos cultivos em ambas as temperaturas as

células entraram na fase estacionária a partir de 8 h. Os dados referentes à velocidade específica de consumo de substrato (μ_s) demonstraram que o substrato é mais rapidamente consumido quando não há a presença do soro de leite no meio, demonstrando que o soro interferiu na metabolização da glicose (Figura 2). Outro aspecto interessante observado foi que a presença de soro de leite afetou negativamente o consumo da glicose (inibição do crescimento), retardando-o em relação aos cultivos realizados com glicose como fonte única de carbono (MADGAN, 2010).

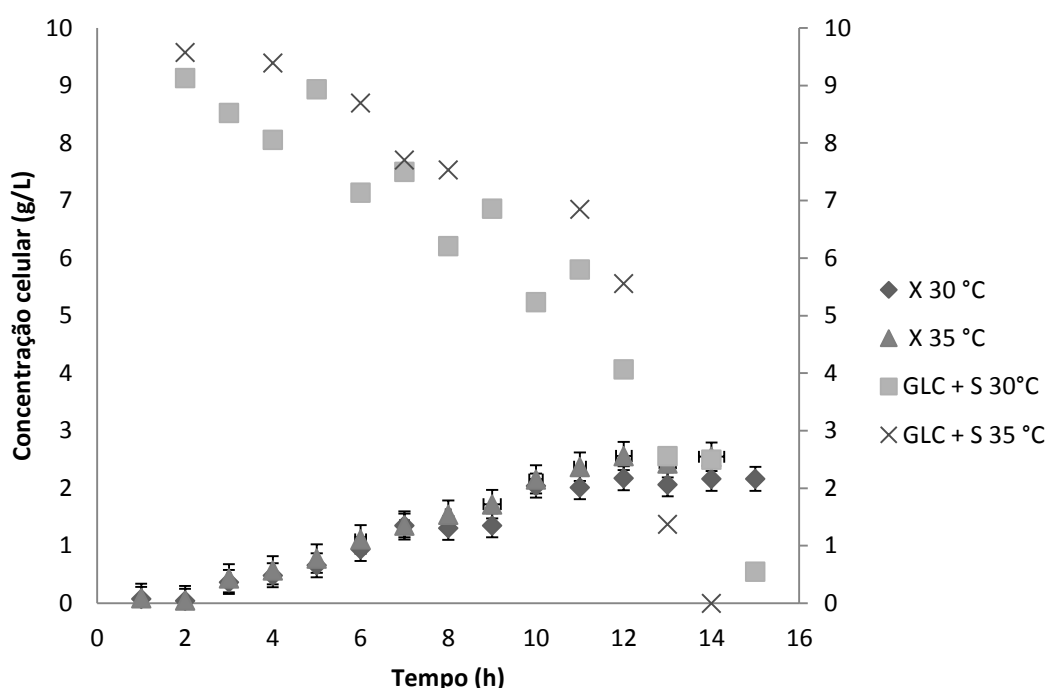


Figura 2. Cinéticas de crescimento e consumo de substrato de *Burkholderia sacchari* LFM 101 para cultivos a 30°C e 35°C com glicose e soro de leite. Onde: X 30 e 35°C correspondem ao crescimento cinético; GLC 30 e 35°C representam o consumo do substrato em glicose e soro de leite.

Destaca-se que para todas as situações, μ_s e $Y_{X/S}$ dos cultivos utilizando soro de leite como co-substrato foram calculados exclusivamente a partir dos dados de glicose, considerando que a concentração de lactose do soro de leite manteve-se praticamente constante ao longo dos cultivos. Através das análises estatísticas principalmente dos dados de μ_s e $Y_{X/S}$ mostraram que houve variação significativa destes resultados perante os outros cultivos, indicando que

algum componente do soro de leite estaria afetando o crescimento e consumo de glicose. A partir destes dados avaliou-se o perfil de crescimento da lactose como co-substrato, tendo em vista que a lactose é o principalmente componente do soro de leite, e que a mesma indicava que poderia estar reprimindo o consumo da glicose nos cultivos contendo soro de leite.

Neste sentido, pode-se observar que os resultados dos cultivos utilizando lactose como co-substrato em ambas as temperaturas o perfil de crescimento foi semelhante, entrando na fase exponencial a partir de 5 h. Pode-se observar na Figura 3, que a temperatura e o consumo do substrato não obtiveram tanta influência sobre o crescimento e o consumo do açúcar. Cabe ressaltar que os valores de μ_s e $Y_{x/s}$ também foram calculados a partir dos dados de glicose, pois a lactose manteve-se constante no decorrer do cultivo. Concluindo que lactose não interferiu no consumo do substrato (glicose), no entanto, este microrganismo não consegue consumir lactose.

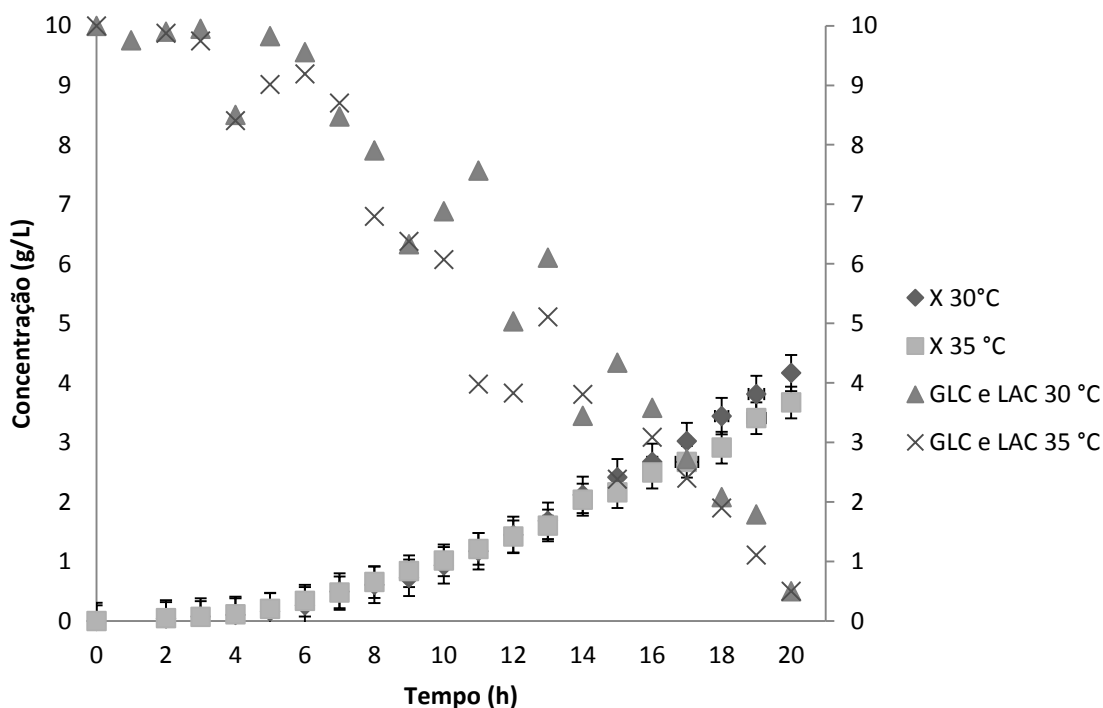


Figura 3. Cinéticas de crescimento e consumo de substrato de *Burkholderia sacchari* LFM 101 para cultivos a 30°C e 35°C com lactose como co-substrato.

Onde: X 30 e 35°C correspondem ao crescimento cinético; GLC 30 e 35°C representam o consumo do substrato em glicose e lactose.

Considerando os resultados de μ_s e $Y_{X/S}$ utilizando a lactose como co-substrato, nota-se que não houve repressão ao consumo de glicose. Sendo que algum outro componente do soro leite influenciou no crescimento e consumo de substrato.

Apesar do soro do leite ser considerado um resíduo rico em nutrientes, e a lactose ser o seu principal componente (FONSECA et al., 2008), existem fatores limitantes do seu uso na produção de polihidroxialcanoatos principalmente pela incapacidade da maioria das bactérias de utilizar a lactose como sua possível fonte de carbono (PANTAZAKI et al., 2009). Grande parte dos estudos atuais avaliam a utilização de soro de leite hidrolisado que disponibiliza glicose e galactose como fontes de carbono no meio de cultivo, o que leva a outra interpretação dos resultados (KOLLER et al., 2008; MARANGONI et al., 2002; POVOLO et al., 2010). Outra aposta é no uso de bactérias recombinantes, visando o aumento da capacidade de conversão do substrato lactose em polímero (ANH et al., 2000; CESCA, 2011; FONSECA, 2003; WONG E LEE, 1998; KIM, 2000).

Como observado anteriormente, os cultivos utilizando o soro de leite apresentaram resultados inferiores à glicose partir das análises realizadas sobre o perfil de crescimento cinético, uma vez que os resultados em produção de polímero também foram inferiores aos cultivos contendo glicose com única fonte de carbono (Tabela 2).

Tabela 2. Caracterização e rendimento em polímero (PHA) *Burkholderia sacchari* LFM 101 para cultivos a 30°C e 35°C com glicose e soro de leite.

Subs.	Temp. (°C)	PHA (%MSC)	PHA (mol%) 3HB	3HB(g/L)	X(R)
GLIC	30	39,57 ± 1,28	100	1,764	2,515
	35	41,43 ± 2,11	100	1,773	2,686
GLIC/ SORO	30	3,00 ± 0,026	100	0,074	2,076
	35	5,14 ± 0,256	100	0,063	1,375

Legenda: Subs.: substrato; GLIC: glicose; SORO: soro de leite; PHA (%MSC): quantidade de PHA em relação a massa seca celular; PHA (mol%) 3HB: Porcentagem de P3HB; 3HB (g/L): Quantidade de polihidroxibutirato; X(R): X residual.

A partir dos resultados da Tabela 2, pode-se observar que o cultivo em glicose na temperatura 35°C apresentou melhor em rendimento em polímero obtendo 41%. Os polímeros contidos em todos os cultivos foram classificados como P(3HB). Considerando que este polímero possui excelentes características tanto em sua produção, quanto aplicação.

O P(3HB) apresenta boa processabilidade em equipamentos comumente usados para processamento de poliolefinas e outros plásticos sintéticos, tornando-se adequado para moldagem por injeção, extrusão, assemelhando suas propriedades aos plásticos sintéticos (STEINBÜCHEL; FÜCHTENBUSCH, 1998; FONSECA, 2003).

Neste sentido, utilizou o substrato glicose e a temperatura 35°C para produção e acúmulo de P(3HB) com o objetivo de desenvolver filmes. Apesar do soro de leite não ter sido considerado um bom co-substrato para realização dos cultivos com *B. sacchari*, e este substrato é rico em proteínas, fez-se o seu uso como um componente para a produção de filmes a partir de PHA.

3.3.3 Caracterização dos filmes compostos a partir de polihidroxialcanoatos e soro de queijo

3.3.3.1 Propriedades dos filmes *multilayer*

Os filmes foram analisados visualmente a fim de selecionar apenas os filmes mais uniformes, a Figura 4 é referente ao PHA puro, conforme as outras figuras respectivamente. Dentre as três espécies de filmes produzidos, visualmente todos se apresentaram simétricos, sem rupturas ou formação de bolhas. É notável nos filmes *multilayer* a presença de maior brilho comparado à amostra padrão PHA, este fato acontece pelas macromoléculas formadas através da solução de gelatina e soro de leite.

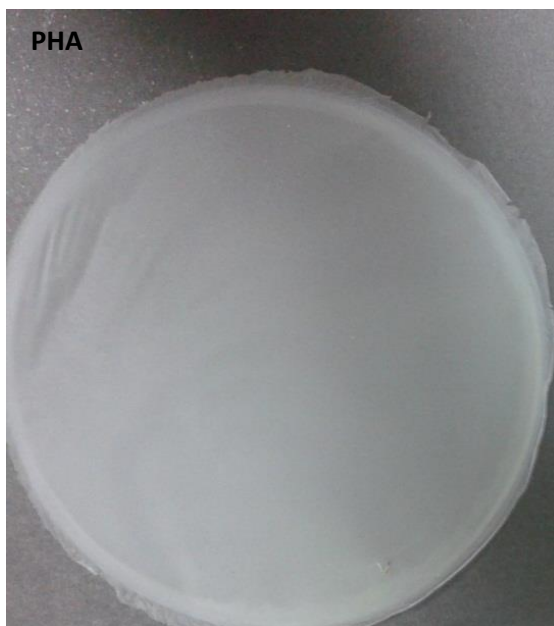


Figura 4. PHA Puro



Figura 5. PHA/Soro 3%

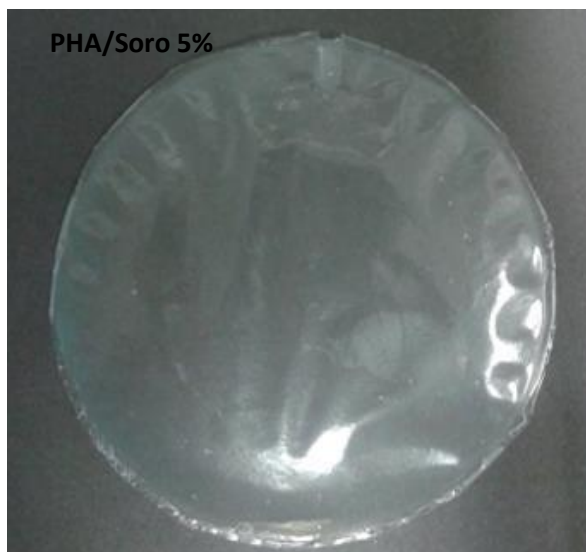


Figura 6. PHA/Soro 5%

As espessuras dos filmes *multilayer* variaram entre si, foram realizados em cinco medidas em locais aleatoriamente diferentes, conforme os dados apresentados na Tabela 3. A permeabilidade e vapor de água (PVA) variou de 0,45 a 0,69 $\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{KPa}^{-1}$ para filmes PHA/Soro 3%, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Espessura e permeabilidade e vapor de água (PVA) dos filmes compostos de PHA, gelatina e soro de leite.

Amostra	Espessura (mm)*	Permeabilidade em vapor de água ($\text{gmm}/\text{m}^2\cdot\text{d}\cdot\text{kPa}$)*
PHA	$0,0274^b \pm 0,004$	$0,697^a \pm 0,06$
PHA/Soro 3%	$0,0392^a \pm 0,001$	$0,347^b \pm 0,06$
PHA/Soro 5%	$0,0448^a \pm 0,005$	$0,457^{a,b} \pm 0,04$

*A medida da espessura dos referentes filmes foram feitas em triplicata, e os resultados apresentado através da média e desvio padrão.

A espessura dos filmes elaborados com PHA aumentaram com adição de gelatina/soro de queijo na mistura. A espessura passou de 0,027 mm para 0,0392 e 0,044 mm respectivamente, considerando que o biofilme de PHA/Soro 5% é mais grosso devido a quantidade de gelatina inserida na solução. Fakhouri

(2009) também observou que quando há adição de uma quantidade maior de gelatina haverá acréscimo na espessura.

A análise de permeabilidade e vapor de água mostrou que os filmes PHA/Soro 3% e PHA/Soro 5% apresentaram valores inferiores a amostra PHA (branco). Este fato acontece, por que os filmes formados de PHA e solução de gelatina nas duas concentrações indicadas eliminaram possíveis microporos na matriz polimérica formando uma matriz mais coesa, que aumentou a barreira água e diminui o valor do PVA. No entanto, a amostra PHA/Soro 5% não é diferente estatisticamente da amostra PHA, assim, a difusão depende do tamanho, formato e polaridade das moléculas penetrantes, assim como do movimento segmentado da cadeia polimérica na matriz do filme. Os fatores que afetam o movimento segmentado de cadeias poliméricas incluem forças atrativas intermoleculares como pontes de hidrogênio e interações de Van der Waals, grau de ligações cruzadas e grau de cristalinidade. As etapas de dissolução e evaporação são influenciadas pela solubilidade do penetrante no filme (WOLF, 2007).

Geralmente filmes multicamadas possuem propriedades mecânicas superiores. No entanto, a incorporação de emulsão com as gotículas na película aumenta a distância percorrida pelas moléculas de água que se difundem através do filme, com isso diminuindo a permeabilidade e vapor de água (TANAKA et al., 2001). Pode-se notar que o filme e PHA/Soro 5% obteve um valor superior ao PHA/Soro 3%. Este fato acontece por que a espessura e a temperatura exercem grande influência na permeabilidade ao vapor de água de filmes com gelatina (CARVALHO, 1997).

Davanço et al. (2007) relatam que filmes e coberturas compostos ou de multicamadas estão sendo investigados, a fim de melhorar as características de permeabilidade, força, flexibilidade. Quando se adiciona um componente hidrofóbico à suspensão formadora do filme, produzem-se filmes compostos, nos quais o componente lipídico atua como barreira ao vapor de água, e a proteína ou polissacarídeo fornecem a barreira ao oxigênio e as características mecânicas necessárias a um bom filme.

Pode-se notar que os filmes *multilayer* constituem propriedades distintas, pelos dados apresentados acima. Estando em acordo com os resultados de solubilidade em água e ácido. Tabela 4.

Tabela 4. Análise de solubilidade em água e ácido das amostras entre o “branco” PHA e PHA/Soro 3 e 5%.

Amostra	Solubilidade em água (%)	Solubilidade em ácido (%)
PHB	0,69 ^c ± 0,19	15,94 ^b ± 0,74
PHB/Soro 3%	9,87 ^b ± 0,91	11,26 ^a ± 1,18
PHB/Soro 5%	17,76 ^a ± 0,02	16,86 ^a ± 1,28

*A análise foi realizada em triplicata e o resultado apresentado através da média e desvio padrão.

As amostras contendo soro de leite, tanto na concentração de 3 quanto na concentração de 5% apresentaram valores de solubilidade em água maiores que o filme simples de PHA. Maior valor de solubilidade em água foi observada para a amostra contendo 5% de soro de leite. Considerando que quando há um maior conteúdo de componentes hidrofílicos no material, aumentará os valores de solubilidade (FAKHOURI et al., 2012)

Perez-Gago e Krochta (2000) consideram que para algumas aplicações de biofilmes exigem que estes sejam até mesmo insolúveis em água para manter a integridade do produto a ser protegido.

No entanto, as amostras de solubilidade em ácido mostraram que o valor das amostras do biofilme simples PHA e a amostra PHA/Soro 5% não diferiram entre si, enquanto que a amostra contendo 3% de soro de leite apresentou uma menor solubilidade em ácido. Esse fato pode se dar ao fato de ter havido uma maior interação polimérica entre as matrizes quando a solução de gelatina 3% e soro de leite foram adicionados.

3.3.3.2 Cor e opacidade

As cores dos filmes foram medidas por meio dos padrões Hunterlab: L*, variando de 0 (preto) a 100 (branco); a*, do verde (-) ao vermelho (+); e b*, do azul (-) ao amarelo (+) (GENNADIOS et al., 1996; KUNTE et al., 1997). Os filmes foram sobrepostos sobre uma superfície de uma placa branca padrão, e os

padrões L*, a* e b* foram medidos indicados em tempo real no leitor do aparelho, como já visto o resultado foi determinado pela diferença de cor (ΔE^*) das amostras em relação ao “branco” (PHA), amostras PHA/soro 5% e PHA/soro 3%. (Tabela 5).

Tabela 5. Análise de cor das amostras entre o PHA/Soro 3 e 5%

Amostra	Diferença de cor segundo Hunterlab*
PHA/Soro 3%	1,44 ^b ± 0,11
PHA/Soro 5%	2,56 ^a ± 0,57

*A análise foi realizada em triplicata e o resultado apresentado através da média e desvio padrão.

Nota-se que o filme PHA/Soro 5% obteve uma coloração maior que a amostra PHA/Soro 3%. Chen (1995) considera que a cor e a opacidade do polímero é consequência da morfologia ou da estrutura química relacionada à massa molecular do material. Considerando que a transparência dos filmes é um aspecto importante para aceitação do consumidor.

Os resultados de opacidade mostraram que o PHA puro considerado “branco” das amostras obteve um valor superior perante os filmes contendo a solução de gelatina e soro de leite, no entanto não houve variação significativa nas amostras. E os filmes PHA/Soro 3% e 5% se aproximam aos valores apresentados por Fakhouri et al. (2012), que indicaram opacidade de 14,5% para filmes a base de amido de mandioca, gelatina e glicerol (Figura 7).

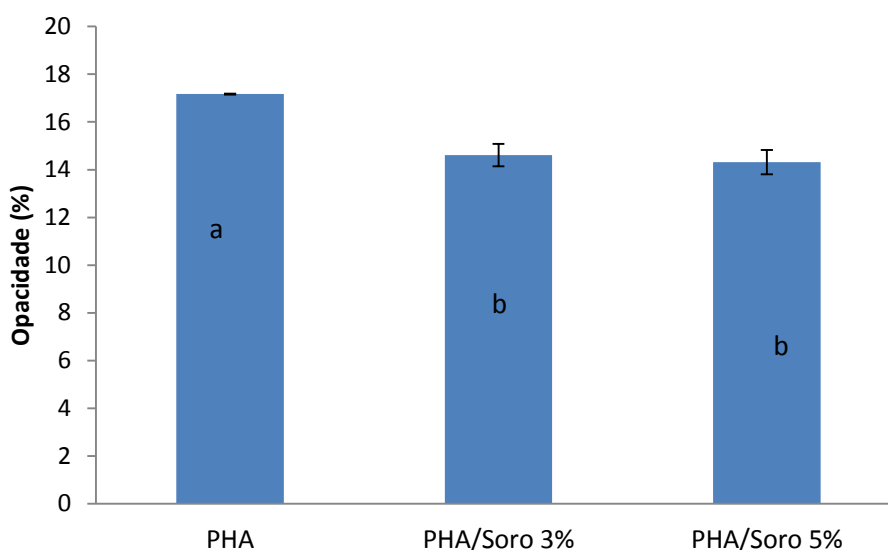


Figura 7. Análise da variância de opacidade dos biofilmes

*A análise foi realizada em triplicata e o resultado apresentado através da média e desvio padrão.

Fakhouri et al. (2007) analisaram que os filmes quem possuem a adição de gelatina, produz melhor cor e maior brilho sensorialmente.

3.3.3.3 Propriedades mecânicas

Perante as análises realizadas de resistência tração pode-se observar que as amostras de PHA/Soro 3 e 5%, conseguiram obter uma resistência a tração maior que a amostra PHA, e a partir da análise estatística pode-se perceber variação significativa entre as amostras. A adição de soro de leite e gelatina nas duas concentrações aumentou a resistência à tração demonstrando que com esta adição, houve melhora na composição do biofilme.

Tabela 6. Propriedades mecânicas dos filmes entre o “branco” PHB, PHB/Soro 3% e 5%.

Amostra	Resistência à tração (Mpa)	Elongação (%)
PHA	9,98 ^a ± 1,82	1,59 ^b ± 0,22
PHA/Soro 3%	33,8 ^b ± 5,52	1,57 ^b ± 0,44

PHA/Soro 5%	26,9 ^c ± 4,82	2,18 ^a ± 0,75
-------------	--------------------------	--------------------------

*As amostras foram realizadas em sextuplicada. resultado apresentado através da média e desvio padrão

Com os resultados de alongação pode-se notar que o filme PHA/Soro 5% obteve uma alongação maior perante as demais amostras, e as outras amostras não possuem variação significativa.

Neste sentido, Gontard et al. (1994) consideram que uma alta resistência à tração é requerida, enquanto que o valor da alongação depende do tipo de aplicação do filme, já que para manter a sua integridade e propriedades de barreira, um filme deve tolerar a tensão normal encontrada durante a sua aplicação, além do transporte e manuseio.

3.3.3.4 Propriedades térmicas

A partir dos dados das análises em calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi possível visualizar que os resultados e comparação entre os filmes PHA/Soro 3 e 5%. A Figura 8 apresenta os resultados das amostras contendo PHA e gelatina 3%, PHA, gelatina 3% acrescida de soro de leite e também a amostra padrão, PHA. Os resultados demonstram que todas as transições vítreas das amostras estão situadas em aproximadamente 115°C, exceto a amostra padrão, que no caso, apresentou um ligeiro deslocamento dessa transição, sendo visualizada em aproximadamente 119°C.

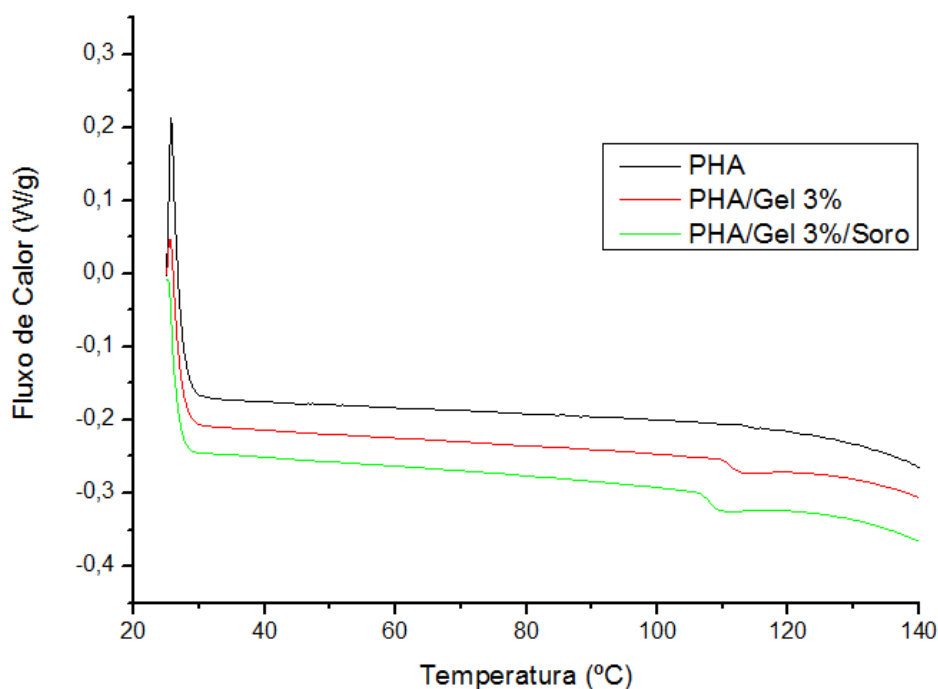


Figura 8. DSC transição vítrea dos filmes compostos por PHA, soro de leite e gelatina 3%.

A transição vítrea é considerada como o valor médio da faixa de temperatura que, durante o aquecimento de um material polimérico que está em uma temperatura muito baixa passa por valores mais altos, permitindo que as cadeias poliméricas que estão na fase amorfa adquiram mobilidade, ou seja, adquiram possibilidade de mudança de conformação (CANEVAROLO JUNIOR; SEBASTIÃO, 2006). Como podemos observar as amostras contendo a concentração de gelatina 3%, acrescida ou não de soro de leite estão todas situadas na mesma faixa de transição juntamente com o PHA (padrão), apresentando uma miscibilidade polimérica entre as amostras.

Os resultados das transições endotérmicas das amostras contendo a concentração de 3% de gelatina nos filmes com PHA pode-se observar transições semelhantes, nas regiões de aproximadamente 174°C, conforme são apresentados na Figura 9. Cabe ressaltar que a aplicação e manuseio deste material, só poderão ser realizados até a faixa de temperatura de 174°C.

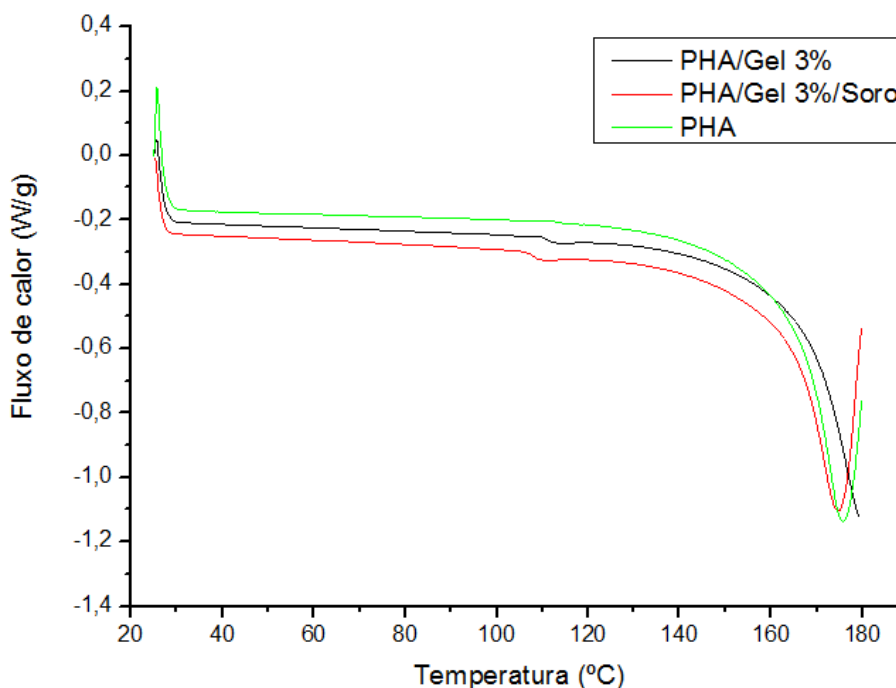


Figura 9. DSC transição endotérmica dos biofilmes compostos por PHA, soro de leite e gelatina 5%.

A Figura 10 apresenta as transições vítreas das amostras contendo PHA e gelatina 5%, PHA, gelatina 5% acrescida de soro de leite, PHA (padrão). A partir dos resultados encontrados na Figura 10 pode-se notar que ocorreram transições vítreas distintas, onde a amostra PHA/Gel 5% está inserida aproximadamente na faixa de 119°C, e as amostras PHA/Soro 5%/Gel e PHA está aproximadamente situadas na mesma faixa 115°C, apresentando também uma miscibilidade polimérica entre as amostras.

As transições endotérmicas das amostras contendo a concentração de 5% de gelatina acrescidos ou não de soro de leite nos filmes de PHA estão situadas em aproximadamente 174°C, este valor está semelhante a transição endotérmica do filme padrão PHA (Figura 11).

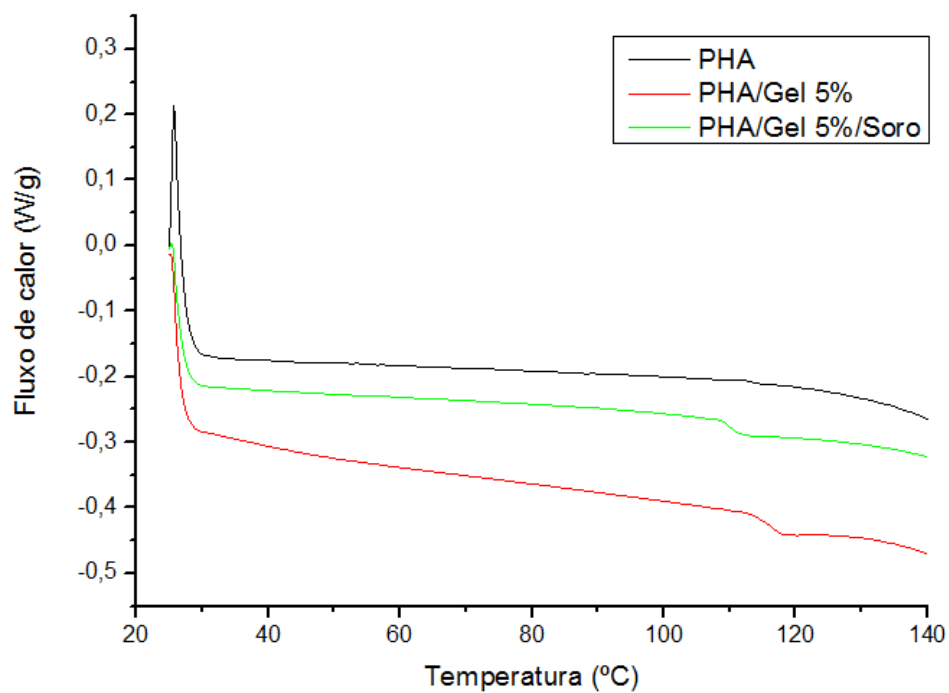


Figura 10. DSC transição vítrea dos filmes compostos por PHA, soro de leite e gelatina 5%.

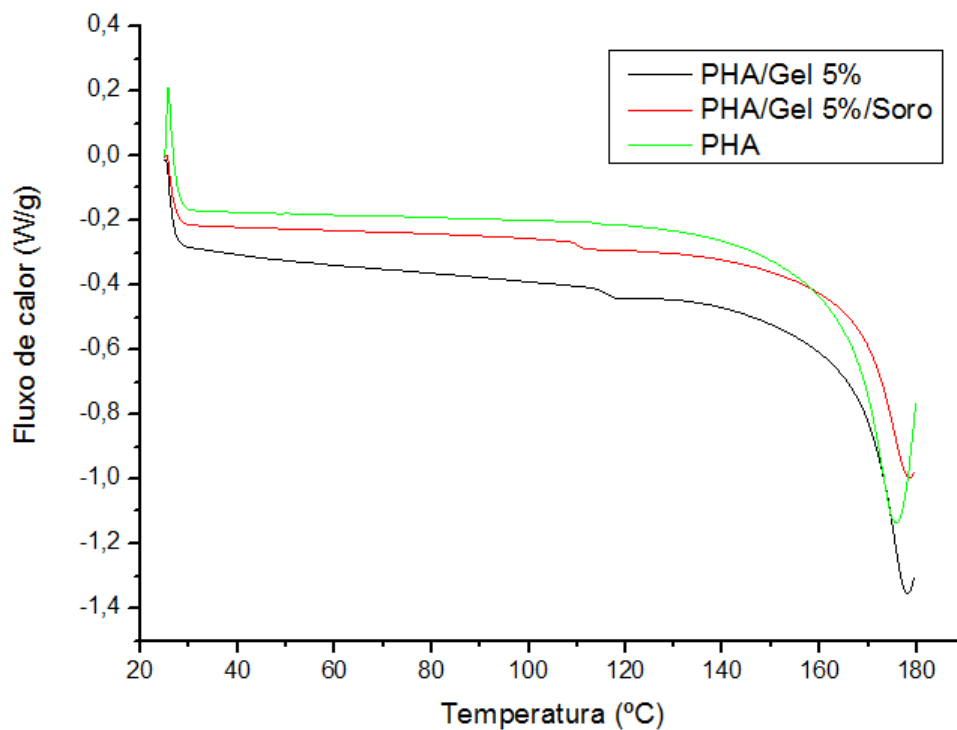


Figura 11. DSC transição endotérmica dos filmes compostos por PHA, soro de leite e gelatina 5%.

Considera-se a partir destes resultados que a temperatura de fusão (T_m) do PHA condiz aos valores encontrados na literatura, para polihidroxialcanoatos produzido a partir de glicose (174°C a 184°C) (FIGUEIREDO et al., 2013; GOMEZ; BUENO, 1997; CAMPOS et al., 2014). Este parâmetro é importante devido às limitações de aplicação de polímeros que apresentam temperatura de degradação térmica próxima à temperatura de fusão em processos de moldagem e que exigem manipulação dos PHA em altas temperaturas (FIGUEIREDO, 2013).

Os ensaios de difração de raio-X demonstraram regiões cristalinas nos filmes. Tais regiões cristalinas são claramente observadas nos picos de difração em 2θ entre 15°C a 33°C. A Figura 12 mostra que existem picos cristalinos situadas em dois 2θ variando de 12,5 a 32,5 estes picos são comuns aos filmes com PHA. Como se pode observar nesta figura há picos mais intensos quando há adição de soro de leite ao filme, diferenciando da amostra PHA/gel 3%.

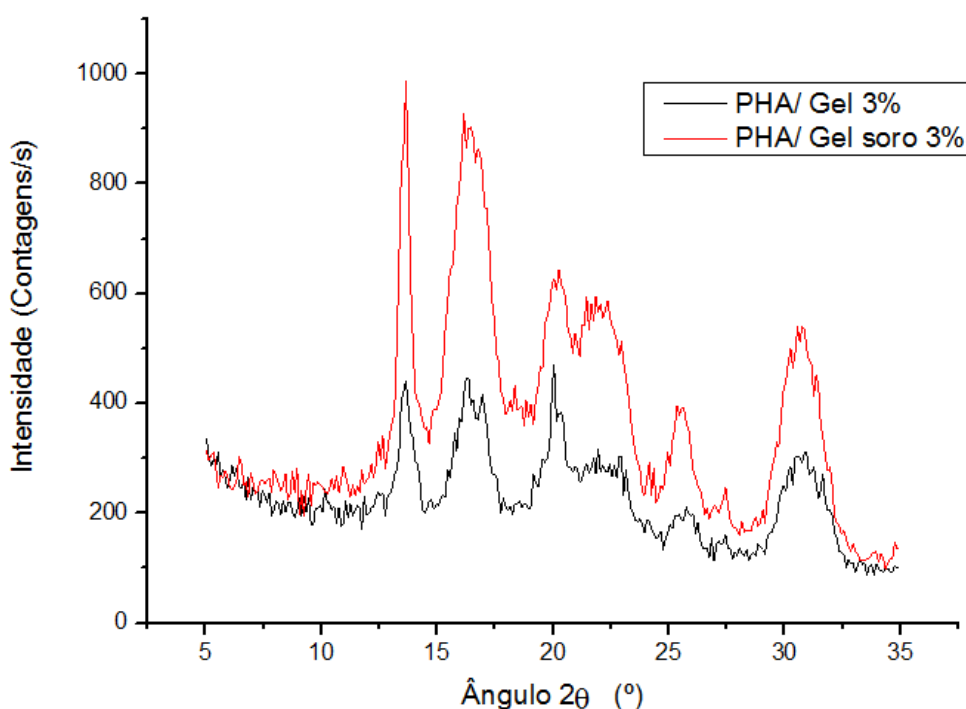


Figura 12. Difração de raios-X nas amostras de filmes de PHA/Soro 3%.

Nos filmes contendo a contração de 5% observa-se que também ocorreram picos mais intensos nas amostras que continham soro de leite, com exceção do pico em $12,5 2\theta$. Figura 13.

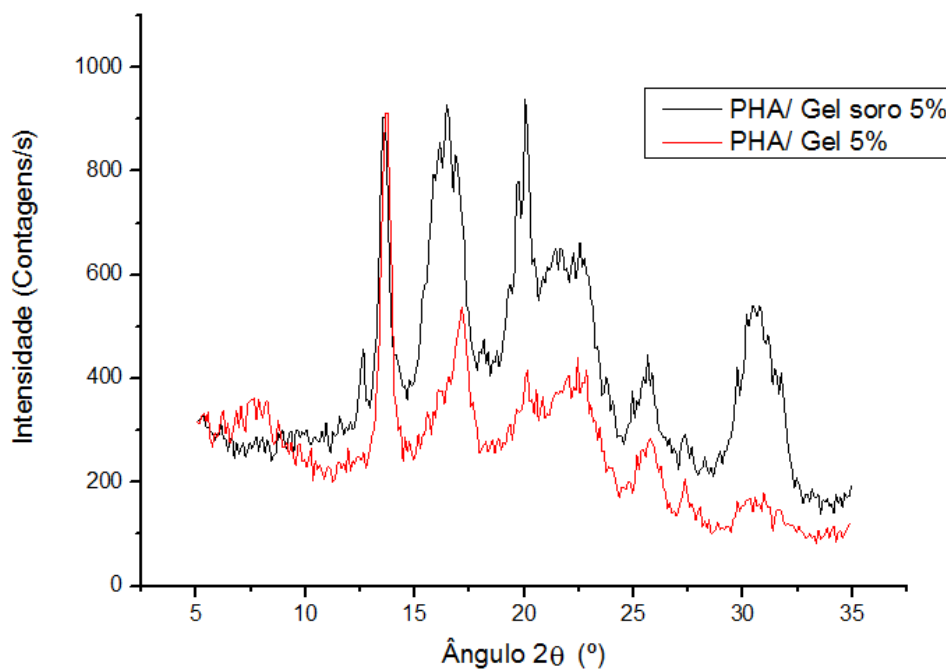


Figura 13. Difração de raios-X nas amostras de filmes de PHA/Soro 5%.

A partir da Figura 14 observa-se o DRX do PHA puro com picos de difração em 2θ entre 15°C a 33°C . Este resultado está conforme reportado pela literatura (CAMPOS et al., 2014; FIGUEIREDO et al., 2013; COSTA, 2012; VOGELSANGER et al., 2003; CATONI, 2011) encontraram os mesmos valores nos picos de difração.

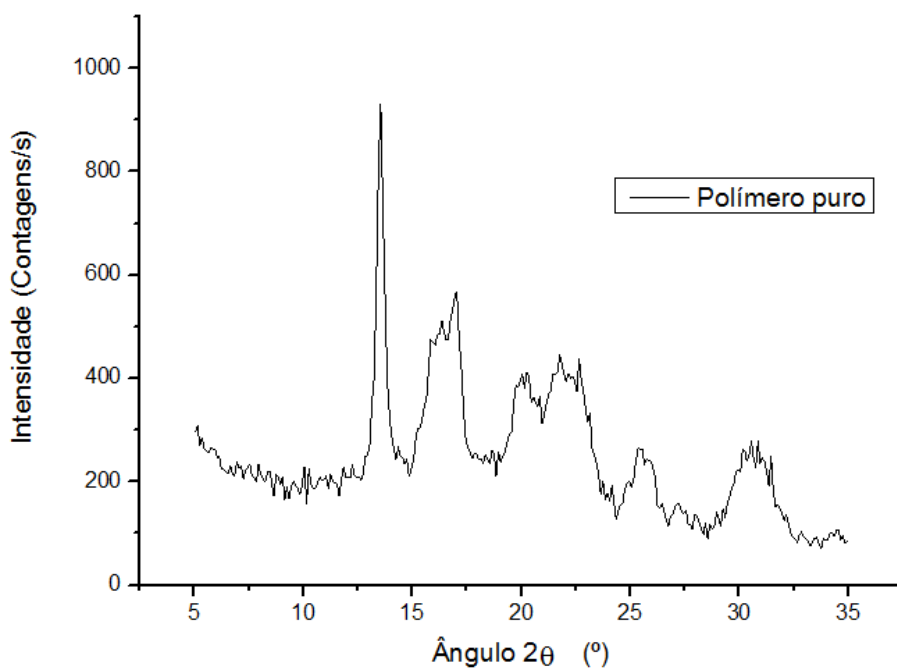


Figura 14. Difração de raios-X nas amostras de filmes de PHA puro.

Os resultados das microscopias eletrônicas de varredura (MEV) obtidas com os filmes de PHA/Soro 3% e PHA/Soro 5% mostraram uma superfície homogênea e sem fissuras. A Figura 15 apresenta as imagens do biofilme com adição de soro de leite na concentração de 3%, imagem (a) mostra uma superfície homogeneia sem fissuras aparentes, e a imagem (b) mostra o recorte da espessura do filme indicando a formação do *multilayer*.

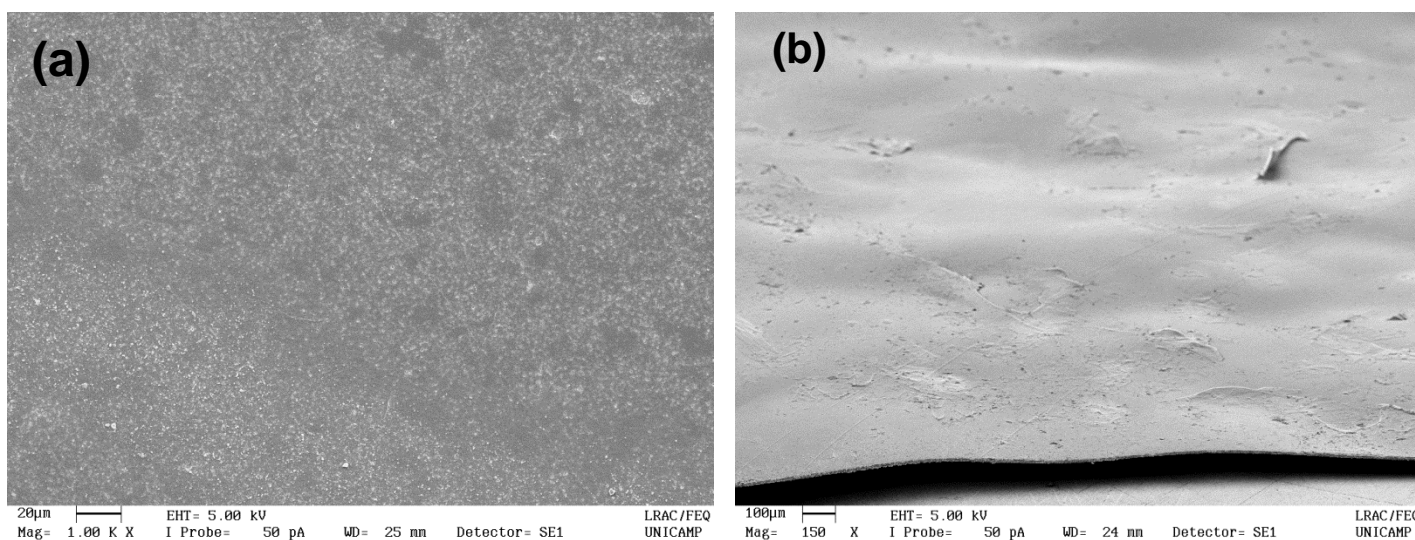


Figura 15. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de filmes PHA/Soro 3% (Imagem (a) superfície; Imagem (b) ruptura).

Conforme a Figura 16 apresentando a MEV do filme PHA/soro de leite 5% também possui as mesmas características do biofilme PHA/soro de leite 3%. Nota-se que é nítido na amostra a camada central de PHA envolta as duas camadas da solução de gelatina e soro de queijo nas concentrações de 3 e 5%.

A microscopia do PHA puro mostrou também uma superfície homogênea e sem fissuras, podendo ser observado na Figura 17.

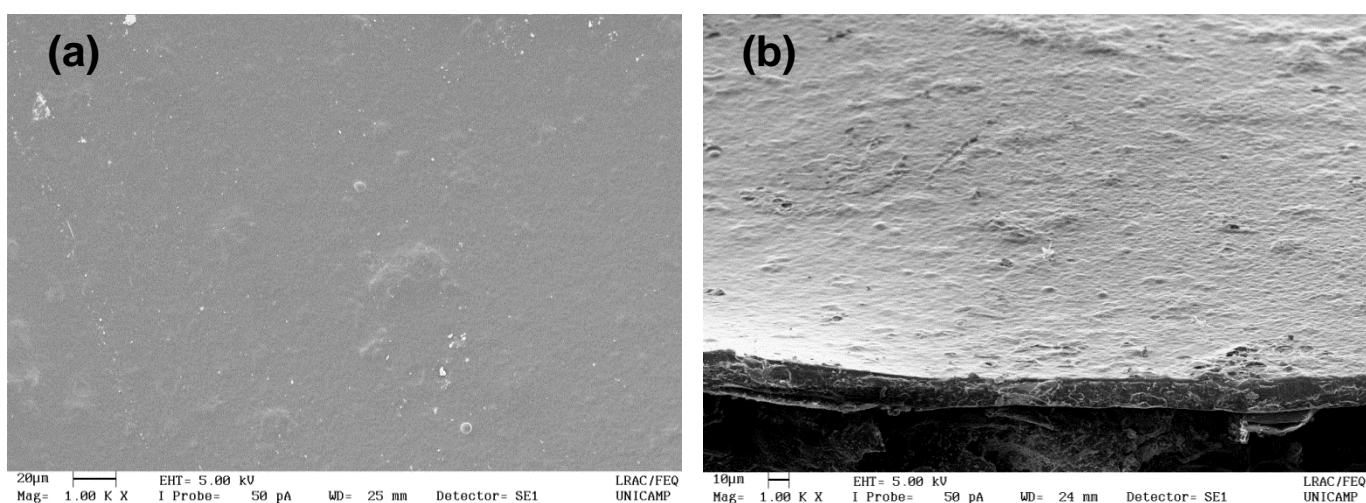


Figura 16. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura do filme PHA/Soro 5% (Imagem (a) superfície; Imagem (b) ruptura).

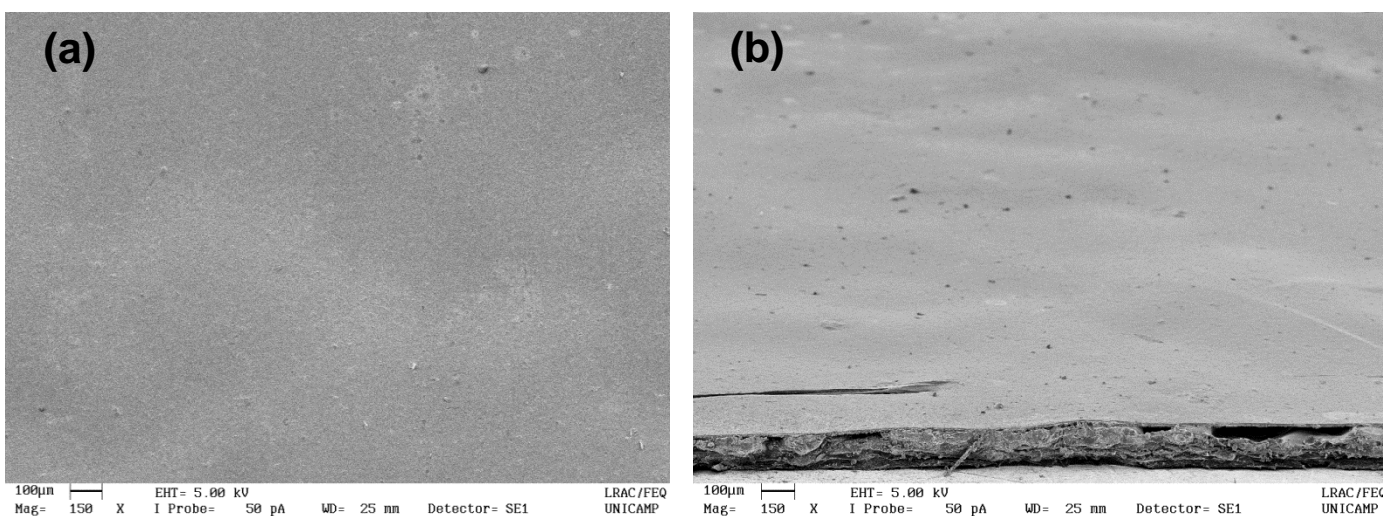


Figura 17. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura do filme PHA puro (Imagem (a) superfície; Imagem (b) ruptura).

O resultado da boa formação dos filmes apresentados pelo MEV é considerado pelo fato de que biofilmes realizados com proteína como a gelatina, são caracterizados por possuírem boas propriedades mecânicas (TAPIA-BLÁCIDO; SOBRAL; MENEGALLI, 2005).

3.4 Conclusão

Concluiu-se que *B. sacchari* LFM 101 apresentou melhor crescimento nos cultivos contendo glicose como fonte única de carbono a temperatura de 35°C, quando comparada aos demais cultivos. Soro de leite interferiu nas cinéticas de crescimento e consumo de substrato, retardando-os, considerando que este microrganismo não tem a capacidade de consumir a lactose contida no soro de queijo, e que esta não inibiu o consumo de glicose, e sim outros componentes contidos no soro de leite.

O soro de leite mostrou-se ser um ótimo componente para produção de filmes, principalmente por sua composição rica em proteínas. Os filmes *multilayer* foram produzidos com o P3HB nas condições de glicose a 35°C, e o uso do soro de leite e adição de gelatina auxiliaram na formação dos filmes dando melhores propriedades físicas de mecânicas, mostrando-se funcionais quanto ao manuseio.

A escolha do melhor filme irá depender da aplicação do mesmo, considerando que na análise das suas características possui um valor positivo para cada aplicação. O filme de soro de leite na concentração de 5% obteve valores significativos perante a amostra de 3%, aumentando a permeabilidade de água, resistência mecânica, tornando este filme mais atrativo para manufatura. No entanto, os filmes com gelatina 3% e soro de leite, possuem características importantes, principalmente pelo fato de que em seu preparo utiliza-se uma quantidade menor de material, diminuindo assim os custos de produção.

3.5 Referências

AHN, W.S; PARK, S.J; LEE, S.Y. Production of poly(3-Hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 8, p. 3624-3627, 2000.

ATLAS, R.M; BARTHA, R. *Microbial ecology: Fundamentals and application*. 3 ed, Oxford, Benjamin Cumming, p.640, 1997.

BRAMMER, C.O; VANDAMME, P; SILVA, L.F; GOMEZ, J.G.C; STEINBUHEL, A. *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, p.1709–1713, 2001.

BRITO, R.M. *Elaboração e caracterização de filmes a base de amido, gelatina, glicerol e óleo essencial*. 2013. 39p. Monografia (Graduação em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina.

CAMPOS, M.I; FIGUEIREDO, T.V.B; SOUSA, L.S; DRUZIAN, J.I. The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of PHA by *Cupriavidus necator* using a response surface methodology and its characterizations. *Industrial Crops and Products*, v 52, p.338– 346, 2014.

CARVALHO, R. A. *Desenvolvimento e caracterização de biofilmes à base de gelatina*. 1997. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de alimentos, Campinas: 1997.

CESCA, K. *Estudo da produção de polihidroxialcanoatos *Escherichia coli* recombinante a partir de soro de queijo*. Dissertação (Mestrado Engenharia de Alimentos), Centro Tecnológico, UFSC, 2011.

CHEN, H. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. *Journal of Dairy Science*, v. 78, n. 11, p. 2563-2583, 1995.

COSTA, C.S. Avaliação de biodegradação de compósitos de Poli(3-hidroxibutirato)/Nanopartículas obtidas a partir do farelo de milho. Monografia, (Graduação em Engenharia de Materiais) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola Politécnica, 2012.

CUQ, B; GONTARD, N; GUILBERT, S. Edible films and coatings as active layers, *Active Food Packaging*, 1995.

D’VILLA, L.D.V. Biofilmes à base de gelatina, aplicados na conservação de frutos de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade). Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Florianópolis, 2010.

DAVANÇO, T; TANADA-PALMU, P; GROSSO, C. Filmes compostos de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou capríco: efeito do pH e da adição de surfactantes sobre a funcionalidade dos filmes. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, v 27, n2, p 408-416, 2007.

DU, C; J. SABIROVA; W. SOETAERT; KI, S.C, LIN. Polyhydroxyalkanoates production from low-cost sustainable raw materials, *Current Chemical Biology*, v. 6, 2012.

FAKHOURI et al. Edible films made from blends of manioc starch and gelatin - Influence of different types of plasticizer and different levels of macromolecules on their properties. *Food Science and Technology*, v. 49, n. 1, p. 149-154, 2012.

FAKHOURI et al. Filmes e coberturas comestíveis compostos à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson. *Ciência e Tecnologia em Alimentos*, v. 27, n. 2, p. 369-375, 2007.

FAKHOURI, F. M. Bioplásticos flexíveis e biodegradáveis à base de amido e gelatina. 2009. 249p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

FAKHOURI, F. M.; FONTES, L. C. B.; GONÇALVES, P. V. M.; GONÇALVES, P. V. M.; MILANEZ, C. R.; STEEL, C. J.; QUEIROZ, F. P. C. Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas *Crimson*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 2, abr./jun. 2007.

FAKHOURI, F.M; COSTA, D; YAMASHITA, F; MARTELLI, S.M; JESUS, R.C; ALGANER, K; COLLARES-QUEIROZ, F.P; INNOCENTINI-MEI, L.H. Comparative study of processing methods for starch/gelatin films, v. 95, p. 681–689, 2013.

FIGUEIREDO, T.V.B; CAMPOS, M.I; SOUSA, S.L; SILVA, J.R; DRUZIAN, J.I. Produção e caracterização de polihidroxicanoatos obtidos por fermentação da glicerina bruta residual do biodiesel. *Química Nova*, v. 37, n. 7, p. 1111-1117, 2014.

FONSECA, G.G. Análise de fluxos metabólicos em *Kluyveromyces fragilis* utilizando substratos marcados com ¹³C. Tese (Doutorado biotecnologia), Instituto de Ciências Biomédicas, USP, 2007.

FONSECA, G.G. Produção de polihidroxicanoatos por *Escherichia coli* recombinante. Dissertação (Mestrado Engenharia de Alimentos), Departamento de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas, UFSC, 2003.

FONSECA, G.G; ANTONIO VASCONCELOS, R. Polyhydroxyalkanoates production by *Escherichia coli* using low cost substrate. *American Journal of food Technology*, v.2, p.12-20, 2007.

FONSECA, G.G; SILVA, L.F; GOMEZ, J.G.C. Biodegradable polyesters from cheese whey. *Advances in Cheese Whey Utilization*. p. 123-145, 2008.

GENNADIOS A., McHUGH T.H., WELLER, C.L., KROCHTA, J.M. Edible coatings and films based on proteins. In: KROCHTA, J. M., BALDWIN, E. A., NISPEROS-CARRIEDO, M. (eds). *Edible coatings and films to improve food quality*. Technomic Publishing Co, Inc. Lancaster USA, 1994.

GENNADIOS, A.; WELLER, C.L.; HANNA, M.A.; FRONING, G.W. Mechanical and barrier properties of egg albumen films. *Journal of Food Science*, v.61, p.585-589, 1996.

GOMEZ, J. G. C.; BUENO NETTO, C. L. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. *Revista Brasileira de Engenharia Química*, Brasil, v. 17, n. 2, p. 24-29, 1997.

GOMEZ, J.G.C.; RODRIGUES, M.F.A.; ALLI, R.C.P.; TORRES, B.B.; BUENO NETTO, C.L., OLIVEIRA, M.S.; SILVA, L.F. Evaluation of soil Gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 45, p. 785-791, 1996.

GONTARD, N., DUCHEZ, C., CUQ, J. L., GUILBERT, S. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapor permeability and other physical properties. *International Journal of Food Science and Technology*, 29: 39-50, 1994.

HUNTERLAB. The color management company. Universal software, version 3.2. Reston, 1997.

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

KOLLER, M; BONA, R; CHIellini, E; FERNANDES, E.G; HORVAT, P; KUTSCHERA, C; HESSE, P; BRAUNEGG, G. Polyhydroxyalkanoate production

from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. *Bioresource Technology*, v. 99, p.4854–4863, 2008.

KUNTE, L.A.; GENNADIOS, A.; CUPPETT, S.L.; HANNA, M.A.; WELLER, C.L. Cast films from soy protein isolates and fractions. *Cereal Chemistry*, Vol.74, n.2, p.115-118, 1997.

LEE, S.Y.; CHOI, J.L. Production of microbial polyester by fermentation of recombinant microorganisms. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, v. 71, p.183-207, 2001.

LOPES, G.C.S. Produção de plásticos biodegradáveis utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Instituto de Ciências Biomédicas, USP, 2010.

MADIGAN, M.T; MARTINKO, J.N; DUNLAP, P.V; CLARK, D.P. *Microbiologia de Brock*. ed. Person,v.12, 2010.

MARAGONI, C; FURIGO, A; ARAGÃO, G.M.F Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding. *Process Biochemistry*, v.38, p.137-141, 2002.

McHUGH T. H, KROCHTA, J. M. Permeability properties of edible films. In: KROCHTA, J. M., BALDWIN, E. A., NISPEROS-CARRIEDO, M. (eds). *Edible coatings and films to improve food quality*. Technomic Publishing Co, Inc. Lancaster USA, 1994.

MICHEL, P; LOGANAYAGI, R; NANCY, D; RANANDKUMAR, S.G; ARULSELVI, P. Isolation and characterization of indigenous *Ralstonia strain*, YRF1 for high polyhydroxy alkanates (PHA) production. *Elixir Appl. Biology*, v.48, p. 9424-942, 2012.

PANTAZAKI, A.A; PAPANEOPHYTOU, C.P; PRITSA, A.G; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, D.A. Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8. *Process Biochemistry*, v.44, p.847–853, 2009.

PEREZ-GAGO, M. P., KROCHTA, J. M. Drying temperature effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein-lipid emulsion films. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 60-74, 2000.

POVOLO, S; TOFFANO, P; BASAGLIA, M; CASELLA, S. Produção de polihidroxicanoatos por engenharia *Cupriavidus necator* de resíduos contendo lactose. *Bioresource Tecnologia*, v.101, n.20, p.7902-7907, 2010.

RISS, V; MAI, W. Gas chromatography determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass-ester hydrochloric acid propanolises. *Juornal Chromatograpy*, v 445, p. 285-289, 1988.

ROCHA, R.C.S; SILVA, L.F; TACIRO, M.K; PRADELLA, J.G.C. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) P(3HB-co-3HV) with a broad range of 3HV content at high yields by *Burkholderia sacchari* IPT 189. *World J Microbiol Biotechnology*, v. 24, p.427–431, 2008.

RODRIGUEZ, J.K.B. Produção de polihidroxicanoatos por linhagens recombinantes de *Escherichia coli*. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, USP, 2012.

SANT'ANA, D.V.P. Análise de fluxos metabólicos aplicada à biossíntese do polímero biodegradável poli-3-hidroxi-burtirato P(3HB) por *Burkholderia sacchari*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Instituto de Ciências Biomédicas, USP, 2013.

SEBASTIÃO, V; CANEVAROLO JUNIOR. Ciência dos polímeros. São Paulo, Ed. Artliber, 2006.

SERPA, L; PRIAMO, W.L; REGINATTO, V. Destino Ambientalmente Correto a Rejeitos de Queijaria e Análise de Viabilidade Econômica. 2nd International Workshop Advances in Cleaner Production, São Paulo, 2009.

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

STEINBÜCHEL, A.; FÜCHTENBUSCH B. Bacterial and other biological systems for polyester production. Trends in Biotechnology, v. 16(10), p. 419-427, 1998.

TANAKA, M; ISHIZAKI, S; SUZUKI, T; TAKAI, R. Water vapor permeability of edible films prepared from fish water soluble proteins as affected by lipid type. Journal of Tokyo University of Fisheries, v. 87, p. 31–37, 2001.

TAPIA-BLÁCIDO, D; SOBRAL, P.J; MENEGALLI, F.C. Development and characterization of biofilms based on Amaranth flour (*Amaranthus caudatus*). Journal of Food Engineering ,v.67, p. 215–223,2005.

VOGELSANGER, N; FORMOLO, M.C; PEZZIN, A.P.T; SCHNEIDER, A.L.S; FURLAN, S.A; BERNARDO, H.P; PEZZIN,S.H; PIRES, A.T.N; DUEKD, E.A.R. Blendas biodegradáveis de poli(3-hidroxi-butirato)/poli(ϵ -caprolactona): obtenção e estudo da miscibilidade, Materials Reserch, v. 6, n.3, p.359-365, 2003.

WOLF, L.K. Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes elaborados a partir de fibra e pó de colágeno. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de São José de Rio Preto, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2007.

WONG, H.H; LEE, S.Y. Poly(3-hydroxybutyrate) productions from whey by high-density cultivation for recombinant *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotchechnol. v.50, p.30-33, 1998.

YOHANNES, G, JUSSILA, M; HARTONEN, K; RIEKKOLA, M-L Asymmetrical flow field-flow fractionation technique for separation and characterization of biopolymers and bioparticles. *Journal of Chromatography*. v.1218, p4104–4116; 2011.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A área de bioplásticos possui grande potencial para a realização de estudos que visam à substituição de materiais provenientes de fontes não renováveis. Uma alternativa possível é a obtenção de filmes multicamadas de polihidroxialcanoatos e soro de leite, pois assim, haveria uma minimização dos impactos ambientais gerados pelo acúmulo de plásticos sintéticos no meio ambiente e também o descarte do soro de leite.

Dentre as atuais demandas ambientais e desenvolvimento tecnológico a produção de polihidroxialcanoatos obtidos de fontes renováveis está em destaque. A utilização destes polímeros, o setor de embalagens tem propiciado estudos e pesquisas a fim de aprimorar cada vez mais estes materiais.

Neste sentido, através dos resultados obtidos pode-se perceber que os filmes *multilayers* de PHA, gelatina em duas concentrações diferentes e acrescidos de soro leite mostraram bons resultados perante suas características físicas, térmicas e mecânicas, e sua aplicabilidade irá depender do produto escolhido.