



4º Congresso Internacional sobre Materiais Plásticos Compostáveis e de Fonte
Renovável
11 e 12 de junho de 2025

ID Nº BIO.12

POLIHIDROXIALCANOATOS: BIOPLÁSTICOS VERSÁTEIS PRODUZIDOS A PARTIR DE MATÉRIAS-PRIMAS E RESÍDUOS RENOVÁVEIS.

José Gregório Cabrera Gomez¹, Luiziana Ferreira da Silva², Marilda Keico Taciro³, José Geraldo da Cruz Pradella⁴, Juliana Cardinali Rezende⁴, Galo Antônio Carrillo Le Roux⁵.

1. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, jgcgomez@usp.br
2. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, lukneif@usp.br
3. Instituto Senai de Inovação Biotecnologia, São Paulo, Brasil, marilda.taciro@sp.senai.br
4. Universidade Federal do ABC, São Paulo, Brasil, jcardinali80@gmail.com
5. Universidade do Vale do Paraíba, São Paulo, Brasil, jpradella51@gmail.com
6. Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, galoroux@usp.br

Resumo

Polihidroxialcanoatos (PHA) são poliésteres acumulados por bactérias na forma de grânulos intracelulares que podem representar até 80% da massa seca bacteriana. Estes polímeros apresentam propriedades termoplásticas, são biodegradáveis ou compostáveis e podem ser produzidos a partir de matérias-primas renováveis, não contribuindo de forma líquida para o aumento da emissão de carbono na atmosfera. Este trabalho descreverá estudos realizados por mais de trinta anos desenvolvendo linhagens bacterianas e processos em biorreatores para a produção de PHA a partir de matérias-primas abundantes no Brasil. Foram selecionadas bactérias produtoras de poli-3-hidroxibutirato (P3HB), o mais conhecido e estudado dos PHA, capazes de converter sacarose e outros carboidratos com a eficiência máxima teórica metabólica. Nesses estudos, destacou-se a bactéria *Burkholderia sacchari*, uma nova espécie bacteriana isolada de solos de canaviais, demonstrando o potencial da biodiversidade brasileira para o desenvolvimento de bioprocessos. A produção de copolímeros contendo 3HB como principal constituinte demonstrou ser uma estratégia eficaz para ampliar as propriedades termomecânicas e, consequentemente, as aplicações de PHA. Os estudos de produção dos copolímeros contendo o monômero 3-hidroxivalerato em sua composição (P3HB-co-3HV) revelou a necessidade de melhoramento genético e maior compreensão do metabolismo do co-substrato (ácido propiônico) para se atingir eficiências melhoradas. A produção dos copolímeros contendo o monômero 3-hidroxihexanoato em sua composição (P3HB-co-3HHx) foi atingida com a expressão de uma enzima PHA sintase proveniente de bactéria do gênero *Aeromonas*, mas revelou possibilidade de melhoramentos adicionais com estudos da beta-oxidação de ácidos graxos. Dentre as matérias-primas/subprodutos estudados temos: sacarose (cana-de-açúcar), xilose (bagaço de cana), glicerol (subproduto biodiesel), melaço de soja (subproduto cadeia soja), pectina (subproduto indústria suco laranja), ácidos orgânicos (obtidos em processos anaeróbios de oxidação de resíduos). Linhagens do gênero *Pseudomonas* demonstraram capacidade de produzir um poliéster com propriedades elastoméricas denominado PHA contendo monômeros de cadeia média (PHA_{MCL}). Estas

bactérias foram a base para o desenvolvimento de linhagens bacterianas recombinantes capazes de produzir P3HB-co-3HHx utilizando carboidratos exclusivamente como fonte de carbono. Bioprocessos em alta densidade celular foram atingidos permitindo o estabelecimento de processos economicamente viáveis e enquadrados em uma bioeconomia. A partir do sequenciamento de genomas, modelos metabólicos têm sido estabelecidos e estudos mais avançados têm sido realizados para avaliar o desempenho bacteriano e melhorar os bioprocessos a partir das diferentes matérias-primas/subprodutos.

Palavras-chave: polihidroxialcanoatos, biodegradáveis, renováveis

1. INTRODUÇÃO

Polihidroxialcanoatos (PHA) são poliésteres acumulados por bactérias na forma de grânulos intracelulares que podem representar até 80% da massa seca bacteriana. Para as bactérias esses polímeros representam reserva de carbono e energia. Entretanto, quando extraídos e purificados apresentam propriedades termoplásticas. Uma vez que são materiais naturalmente produzidos, são biodegradáveis e compostáveis, pois a natureza desenvolveu ferramentas enzimáticas para sua hidrólise. Como são materiais de reserva, são produzidos a partir de matérias-primas renováveis, não contribuindo de forma líquida para o aumento da emissão de carbono na atmosfera. O mais conhecido dos PHA é o poli-3-hidroxibutirato (P3HB) produzido por diversas bactérias.

O primeiro empreendimento para produção de P3HB como termoplásticos ocorreu ainda nos anos 1960 e não foi bem sucedido devido à baixa eficiência no processo de produção e extração na época [1]. No início dos anos 1980, a Imperial Chemical Industries (ICI - Inglaterra) retomou estudos para a produção de P3HB. Uma descoberta disruptiva na época foi a verificação que é possível produzir copolímeros contendo além do 3HB, também unidades 3-hidroxivalerato (P3HB-co-3HV) utilizando ácido propiônico como co-substrato em cultivos com glicose como principal fonte de carbono. Dessa forma, era possível produzir copolímeros com variação gradativa na fração molar de 3HV apresentando propriedades termomecânicas variáveis e atendendo aos requisitos de diferentes aplicações [2].

Ainda nos anos 1980 foi observada a produção de elastômeros da família dos PHA por bactérias do gênero *Pseudomonas*. O PHA produzido por essas bactérias tem o 3-hidroxidecanoato (3HD) como principal constituinte, mas também contém outros monômeros (3-hidroxi octanoato – 3HO, 3-hidroxi hexanoato - 3HHx, 3-hidroxidecanoato – 3HDd). Devido a sua composição, os biopoliésteres produzidos por *Pseudomonas* são denominados PHA contendo monômeros de cadeia média (PHA_{MCL}).

No início dos anos 1990, foi desenvolvida no Brasil tecnologia para a produção de P3HB e copolímeros P3HB-co-3HV utilizando açúcar de cana como principal matéria-prima e integrando-se a produção desses polímeros em uma usina de açúcar e álcool [3-4].

Ainda nos anos 1990, foi descoberto que bactérias do gênero *Aeromonas* são capazes de sintetizar copolímeros de P3HB-co-3HHx a partir de ácidos graxos ou óleos vegetais [5]. Verificou-se que estes copolímeros apresentavam uma faixa mais ampla de propriedades que os copolímeros de P3HB-co-3HV, permitindo inclusive aplicações na forma de filmes plásticos [6].

Assim, PHA são materiais versáteis como bioplásticos tendo propriedades desde materiais mais cristalinos até matérias mais flexíveis. As propriedades termomecânicas destes biopolímeros podem ser moduladas de acordo com sua composição monomérica e também com base em sua massa molar.

2. OBJETIVO

Este trabalho descreverá estudos realizados por mais de trinta anos desenvolvendo linhagens bacterianas e processos em biorreatores para a produção de PHA a partir de matérias-primas abundantes no Brasil.

3. MÉTODOS E MATERIAIS

3.1. Microrganismos

Este trabalho descreverá estudos realizados por mais de trinta anos desenvolvendo linhagens bacterianas e processos em biorreatores para a produção de PHA a partir de matérias-primas abundantes no Brasil.

3.2. Cultivos de avaliação inicial – agitador rotativo

Bactérias isoladas foram cultivadas em frascos de Erlenmayer com meio de sais minerais correspondendo a 20% do volume do frasco. Os cultivos foram conduzidos em agitador rotativo orbital (150 rpm, 30°C).

3.3. Cultivos em biorreator

Para determinação de parâmetros cinéticos do bioprocesso, bem como para o desenvolvimento de bioprocessos aplicáveis industrialmente em escala de bancada foram utilizados biorreatores de até 10 litros de volume útil, com controle automático de temperatura e pH. Oxigênio dissolvido foi controlado manualmente ou automaticamente dependendo do bioprocesso em desenvolvimento. Foram realizados bioprocessos em batelada alimentada para explorar o máximo de produção de PHA.

3.4. Métodos analíticos

Massa seca celular foi determinada por gravimetria. O teor e composição de PHA foram determinados por cromatografia gasosa após propanólise de células secas ou PHA purificado. Carboidratos e ácidos orgânicos foram determinados por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

4. RESULTADOS

4.1. Seleção de bactérias produtoras de P3HB

O primeiro isolamento de bactérias realizado foi para selecionar bactérias produtoras de P3HB. Foram selecionadas bactérias capazes de utilizar sacarose, glicose e frutose como fontes de carbono, pois são os principais carboidratos encontrados na cana de açúcar. Algumas das bactérias isoladas atingiram a eficiência máxima teórica de conversão dos carboidratos em P3HB, indicando a não necessidade de trabalhos de melhoramento genético, mas apenas uma boa seleção [7].

A coleção de bactérias produtoras de P3HB a partir de carboidratos da cana de açúcar também demonstrou ter bactérias capazes de utilizar xilose como fonte de carbono [8]. A utilização de xilose como fonte de carbono pode representar a oportunidade de integrar a produção de PHA em um sistema de produção de açúcar e álcool de segunda geração [9].

Nesses estudos, destacou-se a bactéria *Burkholderia sacchari*, uma nova espécie bacteriana isolada de solos de canaviais, demonstrando o potencial da biodiversidade brasileira para o desenvolvimento de bioprocessos [10].

4.2. Desenvolvimento de linhagens bacterianas produtoras de P3HB-co-3HV.

A produção de copolímeros contendo 3HB como principal constituinte demonstrou ser uma estratégia eficaz para ampliar as propriedades termomecânicas e, conseqüentemente, as aplicações de PHA [2]. Os estudos iniciais de produção dos copolímeros P3HB-co-3HV revelaram a necessidade de melhoramento genético e maior compreensão do metabolismo do co-substrato (ácido propiônico) para se atingir eficiências melhoradas [7]. Mutantes deficientes no metabolismo de propionato foram obtidos e atingiram eficiências melhoradas na conversão de propionato em unidades 3HV [11]. Foi demonstrado que a via do 2-metilcitrato é a principal via de oxidação de propionato em *B. sacchari* [12], embora essa não seja a única via de oxidação de propionato nessa bactéria [13], abrindo perspectivas para desenvolvimentos adicionais do bioprocessos de produção do copolímero P3HB-co-3HV utilizando propionato como co-substrato.

Estimativas realizadas demonstraram que o custo de produção de P3HB-co-3HV contendo 10, 20 ou 30 mol% de 3HV é bastante similar ao custo de produção de P3HB se forem atingidas eficiências de conversão do propionato em unidades 3HV próximas ao valor máximo teórico [14].

4.3. Desenvolvimento de linhagens bacterianas produtoras de P3HB-co-3HHx.

Inicialmente, foi avaliada a produção de copolímeros do tipo P3HB-co-3HHx por *B. sacchari* utilizando ácido hexanóico como co-substrato [15], entretanto o ácido hexanóico foi convertido em 3HHx com baixa eficiência. Assim, foi construído um mutante de *B. sacchari* deficiente na produção de PHA e genes de biossíntese de PHA de *Aeromonas* sp. foram expressos nesse mutante. Dessa forma, foi possível produzir P3HB-co-3HHx com diferentes frações molares de 3HHx e com eficiência correspondendo a 50% do valor máximo teórico [16-17]. Melhoramentos adicionais poderão ser atingidos com estudos da beta-oxidação de ácidos graxos.

De forma semelhante, foi possível produzir P3HB-co-3HHx a partir de frutose e ácido hexanóico por linhagem recombinante de *Cupriavidus necator* albergando genes de biossíntese de PHA de *Aeromonas* sp.

Uma vez que linhagens do gênero *Pseudomonas* são capazes de produzir PHA_{MCL}, foi obtido mutante deficiente na produção de PHA de um isolado eficiente na conversão de carboidratos em PHA. Expressando os genes de biossíntese de PHA de *C. necator* foi possível produzir um terpolímero de P3HB-co-3HHx-co-3HO. Com a expressão dos genes de biossíntese de PHA de *Aeromonas* sp., foi produzido um P3HB-co-3HHx com elevada fração de 3HHx [18]. Esses PHA foram produzidos utilizando exclusivamente glicose como fonte de carbono, ou seja, sem a necessidade dos co-substratos precursores dos comônômeros.

4.4. Desenvolvimento de bioprocessos de produção.

A produção industrial de PHA para aplicação como bioplástico em grande escala requer altas produtividades volumétricas. Essas produtividades são atingidas em processos em alta densidade celular. Diferentes estratégias de engenharia bioquímica foram realizadas, demonstrando que processos de produção podem ser desenvolvidos para produzir diferentes PHA com altas produtividades [14, 19-21]. Assim, temos avançando no estabelecimento de processos economicamente viáveis e enquadrados em uma bioeconomia.

4.5. Matérias-primas para produção de PHA.

Embora um enfoque deste trabalho seja na diversidade de PHA produzidos, os estudos estão focadas também na detecção de bactérias capazes de utilizar diferentes fontes de carbono para a produção destes bioplásticos. O foco principal é em matérias-primas que sejam componentes de resíduos/subprodutos gerados em grande quantidade no Brasil. Destacamos: sacarose (cana-de-açúcar), xilose (bagaço de cana), glicerol (sub produto biodiesel), melaço de soja (subproduto cadeia soja), pectina (subproduto indústria suco laranja), ácidos orgânicos (obtidos em processos anaeróbios de oxidação de resíduos).

4.6. Modelos metabólicos e o desenvolvimento da produção de PHA.

A seleção de bactérias relevantes para a produção de PHA levou ao próximo passo para aprofundar a compreensão de seu metabolismo e estabelecer estratégias para o melhoramento genético por abordagens de Engenharia Metabólica. Os genomas de *B. sacchari* [22] e *Pseudomonas* produtora de PHA_{MCL} [23] foram sequenciados. A partir de dados genômicos foi possível reconstruir a rede metabólica da linhagem de *Pseudomonas* [24]. Estudos de fluxômica estão sendo realizados e deverão permitir uma melhor compreensão do funcionamento celular em busca de melhorar o desempenho [25]. Modelos que permitem avaliar o impacto do processo de produção no custo final do bioproduto também têm sido aplicados [26].

5. CONCLUSÃO

Os trabalhos desenvolvidos até o momento permitiram o estabelecimento de uma coleção de bactérias capazes de converter eficientemente diferentes fontes de carbono em PHA de composições variáveis e atendendo requisitos para diversas aplicações. Bioprocessos economicamente viáveis têm sido desenvolvidos. Estratégias de Engenharia metabólica estão sendo desenvolvidas com a caracterização adequada das bactérias em modelos metabólicos e o estabelecimento de estratégias para o melhoramento adicional de seu desempenho.

6. RECONHECIMENTOS

As bolsas de produtividade do CNPq concedidas a Luiziana Ferreira da Silva (302821/2022-8), Galo Antonio Carrillo Le Roux. (311550/2022-3) e José Gregório Cabrera Gomez (311932/2022-3) contribuíram para a realização deste trabalho.

7. REFERÊNCIAS

- [1] Baptist, J.N. Process for preparing poly- β -hydroxybutyric acid. (1962) US Patent Application 3036959.
- [2] Holmes, P.A. Application of PHB: a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Phys. Technol.* (1985), 32–36.
- [3] Nonato, R.V.; Mantelatto, P.E.; Rossell, C.E. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2001) 57, 1–5.
- [4] Rossell C.; Mantelatto P.; Agnelli J.; and Nascimento J. Sugar-based biorefinery – technology for integrated production of poly(3-hydroxybutyrate), sugar, and ethanol, in *Biorefineries-Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions*, ed. by Kamm B, Gruber P and Kamm M. Wiley VCH, Weinheim, pp. 209–226 (2005).
- [5] Kobayashi, G.; Shiotani, T.; Shima Y. Biosynthesis and Characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from oils and fats by *Aeromonas* sp. OL-338 and *Aeromonas* sp. FA-440. In: Doi, Y. &

Fukuda, K. (eds) Biodegradable Plastics and Polymers, Tokio:Elsevier (1994) 410-416.

[6] Doi, Y.; Kitamra, S.; Abe, H. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromol.* (1995) 28, 4822-4828.

[7] Gomez, J.G.C., Rodrigues, M.F.A., Alli, R.C.P., Torres, B.B., Bueno Netto, C.L., Oliveira, M.S., Da Silva, L.F. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* (1996) 45, 785-791.

[8] Silva, L.F., Taciro, M.K., Michelin Ramos, M.E., Carter, J.M., Pradella, J.G.C., Gomez, J.G.C. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (2004) 31, 245-254.

[9] 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. *Int. J. Biol. Macromol.* (2014) 71, 2-7.

[10] Bramer, C.O.; Vandamme, P.; Silva, L.F.; Gomez, J.G.C.; Steinbüchel, A. Polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (2001) 51, 1709-1713,

[11] Silva, L.F., Gomez, J.G.C., Oliveira, M.S., Torres, B.B. Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (P3HB-co-3HV) production by *Burkholderia* sp. *J. Biotechnol.* (2000) 76, 165-174.

[12] Brämer, C.O., Silva, L.F., Gomez, J.G.C., Priefert, H., Steinbüchel, A. Identification of the 2-methylcitrate pathway involved in the catabolism of propionate in the polyhydroxyalkanoate-producing strain *Burkholderia sacchari* IPT101^T and analysis of a mutant accumulating a copolyester with higher 3-hydroxyvalerate content. *Appl Environ Microbiol* (2002) 68, 271-279.

[13] Pereira, E.M., Silva-Queiroz, S.R., Gregó, J., Gomez, C., Ferreira Silva, L. Disruption of the 2-methylcitric acid cycle and evaluation of poly-3-hydroxybutyrate-co-3- hydroxyvalerate biosynthesis suggest alternate catabolic pathways of propionate in *Burkholderia sacchari*. *Can. J. Microbiol.* (2009) 55, 688-697.

[14] Rocha, R.C.S., Da 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. Biotechnol.* (2008) 24, 427-431.

[15] Mendonça, T.T., Gomez, J.G.C., Buffoni, E., Sánchez Rodriguez, R.J., Schripsema, J., Lopes, M.S.G., Silva, L.F. Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates. *J. Appl. Microbiol.* (2014) 116, 815-829.

[16] Mendonça, T.T., Tavares, R.R., Cespedes, L.G., Sánchez-Rodriguez, R.J., Schripsema, J., Taciro, M.K., Gomez, J.G.C., Silva, L.F. Combining molecular and bioprocess techniques to produce poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with controlled monomer composition by *Burkholderia sacchari*. *Int. J. Biol. Macromol.* (2017) 98, 654-663.

[17] Oliveira-Filho, E.R.; Macedo, M.A.; Lemos, A.C.C.; Adams, F.; Merkel, O.M.; Taciro, M.K.; Gomez, J.G.C.; Silva, L.F. Engineering *Burkholderia sacchari* to enhance poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) [P(3HB-co-3HHx)] production from xylose and hexanoate. *Int. J. Biol. Macromol.* (2022) 213, 902-914.

[18] Cespedes, L.G., Nahat, R.A.T.P.S., Mendonça, T.T., Tavares, R.R., Oliveira-Filho, E.R., Silva, L.F., Taciro, M.K., Sánchez, R.J., Gomez, J.G.C. A non-naturally-occurring P(3HB-co-3HA_{MCL}) is produced by recombinant *Pseudomonas* sp. from an unrelated carbon source. *Int. J. Biol. Macromol.* (2018) 114, 512-519.

[19] Diniz, S.C., Taciro, M.K., Gomez, J.G.C., Pradella, J.G.C. High-Cell-Density Cultivation of *Pseudomonas putida* IPT 046 and Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Production From Sugarcane Carbohydrates. *Appl. Biochem; Biotechnol;* (2004) 119, 51-69.

[20] Pradella, J.G.C.; Taciro, M.K., Mateus, A.Y.P. High-cell-density poly (3-hydroxybutyrate) production from sucrose using *Burkholderia sacchari* culture in airlift bioreactor. *Biores. Technol.* (2010) 101, 8355-8360.

[21] Pradella, J.G.C.; Ienczak, J.L., Delgado, C.R., Taciro, M.K. Carbon source pulsed feeding to attain high yield and high productivity in poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production from soybean oil using *Cupriavidus necator*. *Biotechnol. Let.* (2012) 34, 1003-1007.

[22] Alexandrino, P.M.R.; Mendonca, T.T.; Guaman Bautista, L.P.; Cherix, J.; Lozano-Sakalauskas, G.C.; Fujita, A.; Ramos Filho, E.; Long, P.; Padilla, G.; Taciro, M.K.; Gomez, J.G.C.; Silva, L.F. Draft genome

sequence of the polyhydroxyalkanoateproducing bacterium *Burkholderia sacchari* LMG 19450 isolated from Brazilian sugarcane plantation soil, *Genome Announc.* (2015) 3, 3.

[23] Cardinali-Rezende, J., Alexandrino, P.M.R., Nahat, R.A.T.P. de S., Sant'Ana, D.P.V., Silva, L.F., Gomez, J.G.C., Taciro, M.K. Draft genome sequence of *Pseudomonas* sp. strain LFM046, a producer of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate. *Genome Announc.* (2015) 3, 45–46.

[24] Cardinali Rezende, J., Di Genova, A., Nahat, R.A.T.P.S., Steinbüchel, A., Sagot, M.F., Costa, R.S., Oliveira, H.C., Taciro, M.K., Silva, L.F., Gomez, J.G.C. The relevance of enzyme specificity for coenzymes and the presence of 6-phosphogluconate dehydrogenase for polyhydroxyalkanoates production in the metabolism of *Pseudomonas* sp. LFM046. *Int. J. Biol. Macromol.* (2020) 163, 240–250.

[25] de Oliveira, R.D., Novello, V., da Silva, L.F., Gomez, J.G.C., Le Roux, G.A.C. Glucose metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* is cyclic when producing Polyhydroxyalkanoates and Rhamnolipids. *J. Biotechnol.* (2021) 342, 54–63.

[26] Santos, W.O., de Oliveira, R.D., Gomez, J.G.C., Comp. Aided Chem. Eng. (2024) 53, 2599-2604. Le Roux, G.A.C. Use of dynamic Flux Balance Analysis for evaluation of the poly-3-hydroxybutyrate production potential of recombinant *Escherichia coli*