



MODELAGEM FENOMENOLÓGICA PARA A SIMULAÇÃO DA PRODUÇÃO DO BIOPOLÍMERO P(3HB).

Débora Jung Luyizetto¹, Rossano Gambetta³, Argimiro Resende Secchi¹, Nilo Sérgio Medeiros Cardozo¹, Rosane Rech², Marco Antonio Zacchia Ayub², Tito Lívio Moitinho³.

¹Grupo de Integração, Modelagem, Simulação, Controle e Otimização de Processos (GIMSCOP)
Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
R. Eng. Luis Englert, s/n. Campus Central. CEP: 90040-040 - Porto Alegre - RS - BRASIL,
E-MAIL: { debora, nilo, arge }@enq.ufrgs.br

²Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) Porto Alegre - RS – BRASIL, E-MAIL: {rrech, mazyub}@ufrgs.br

³Programa de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (COPPE/ UFRJ)
Rio de Janeiro – RJ – BRASIL, E-MAIL: {rossano, tito}@peq.coppe.ufrj.br

Palavras Chaves: biopolímeros, poly(3-Hydroxybutyrato), modelagem

Resumo: Será mostrado neste trabalho a modelagem fenomenológica da produção do P(3HB), crescimento celular, crescimento das cadeias do polímero e consumo de substrato, visando no futuro obter um modelo capaz de prever as características finais do polímero obtido. O modelo do processo em reator batelada está sendo implementado no simulador EMSO. Os resultados preliminares mostram que é possível avaliar as características do produto gerado através da construção de curvas de distribuição de massas moleculares.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, os polímeros representam uma parcela muito importante do mercado de produtos para embalagens. No entanto, como a maioria dos polímeros comerciais caracteriza-se por apresentar taxas de decomposição quase desprezíveis nas condições ambiente, a disposição final de resíduos plásticos vem tornando-se um problema crítico para a sociedade e causando danos ao meio ambiente.

Neste contexto a utilização de biopolímeros torna-se uma alternativa interessante, tendo em vista que uma de suas principais características é a biodegradabilidade e que a reação de degradação gera como produtos somente H₂O e CO₂. Além disso os biopolímeros são obtidos a partir de fontes renováveis, podendo-se utilizar uma variedade de substratos como, por exemplo, sacarose, amido, metano, óleo mineral e subprodutos da agroindústria como melão, soro de leite, entre outros, não ficando sujeitos às oscilações de preço do petróleo nem a escassez deste.

Biopolímeros compreendem uma larga variedade de polímeros sintetizados por organismos vivos. Estes são classificados de acordo com sua estrutura em: ácidos nucleicos, polianidridos, polioésteres, politioésteres, polissacarídeos, poliisoprenoides polifenóis e poliamidas.^{1,2} Dentre os polioésteres destacam-se os Polihidroxialcanoatos (PHAs), que são sintetizados por microorganismos como reserva de carbono e energia que, em geral, ocorre quando há excesso de fonte de carbono e limitação de algum nutriente essencial como nitrogênio, fósforo entre outros.^{2,3}

Os PHAs são polímeros termoplásticos e ou elastômeros, atóxicos, enantiômeros puros, insolúveis em água, impermeáveis ao ar, biocompatíveis e biodegradáveis.² O poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)) é o mais difundido e melhor caracterizado membro dos PHAs. O P(3HB) é altamente cristalino e possui algumas propriedades semelhantes ao polipropileno.^{4,10} Na Figura 1 é possível verificar a composição de alguns tipos de PHAs.



Oktober Fórum 2005 – PPGEQ

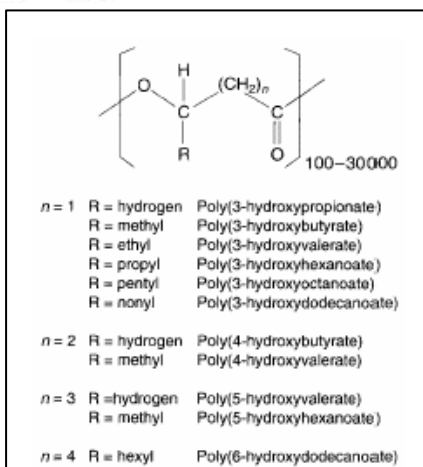


Figura 1: Formulas de alguns PHAs (Lee,1996).

Através da modelagem é possível prever o crescimento microbiano consumo de substrato e formação de produto, otimizar as condições de cultivo e perfis de alimentação. Além disso, o modelo matemático pode ser usado como ferramenta para testar hipóteses para estruturas regulatórias, uma vez que produtos biotecnológicos são obtidos de organismos vivos normalmente através de rotas metabólicas interconectadas e pouco elucidadas.¹¹

Nos estudos tradicionais de cultivos biotecnológicos, metabólitos extracelulares podem ser medidos, como substratos, produtos, bem como biomassa. Assim é possível desenvolver modelos baseados nessas variáveis. Esses modelos são classificados como não estruturados, são bastante utilizados, porém possuem dificuldades de prever o comportamento celular para diferentes condições. A medida que se consegue quantificar metabólitos intracelulares, consegue-se formular modelos estruturados que aumentam a capacidade de predição da fisiologia celular.

Gombert and Nielsen (2000) dividem os modelos de acordo com a estrutura em: estequiométricos os quais são baseados nas características das redes metabólicas que são invariantes no tempo e em modelos cinéticos os quais são baseados tanto em estequiometria como também na cinética enzimática ou microbiana. Nos modelos estequiométricos relaciona-se a estequiometria com taxas de reação definidas em um balanço de massa. Quando se tem disponível informação sobre a cinética de um processo específico é possível descrever a dinâmica deste processo através da combinação da cinética com a estequiometria das rotas metabólicas.

Outra maneira de considerar aspectos regulatórios de metabolismo celular é pela adição de princípios cibernéticos, nestes casos são introduzidas variáveis cibernéticas no modelo cinético a fim de substituir um mecanismo regulatório desconhecido por uma função objetivo supondo que o metabolismo opera com objetivo global de otimizar o crescimento.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Microorganismo e condições de cultura: será cultivado a Bacteria *Alcaligenes latus* (DSM 1123) cedida pela Fundação Osvaldo Cruz para a produção do P(3HB). Atualmente estão guardadas liofilizadas em uma ampola. O meio de cultura será composto por 20 g/l de sacarose, 3g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e outros micronutrientes. Serão realizados cultivos batelada e batelada alimentada em um biorreator de 2l Biostat B, Braun Biotech International, conectado a um computador remoto para aquisição de dados. A temperatura e pH do cultivo serão mantidos constantes em 30°C e pH 6,5.

Procedimentos analíticos: As células serão medidas por turbidimetria em um espectrofotômetro a 620 nm, seguindo curva padrão obtida por peso seco. A sacarose será analisada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Para determinação da concentração de P(3HB) será utilizado o método da propanólise analisado em um cromatografo gasoso (CG).¹² A curva de distribuição de peso molecular será obtido utilizando-se um cromatografo de permeação em gel (GPC).

Modelo Estruturado: Na maioria dos organismos, o PHB é sintetizado a partir de um composto chave, a acetil coenzima-A (AcCoA), por uma seqüência de 3 reações catalisadas pelas enzimas: 3-Cetotiolase (acetil-CoA acetiltransferase), Acetoacetil-CoA redutase (hidroxibutiril-CoA desidrogenase) e a poli(3-hidroxibutirato) sintase (PHB polimerase).^{4,5,6} A AcCoA é levada à Acetoacetil coenzima-A (AcAcCoA) através da reação de poli condensação reversível, esta é então reduzida a 3-hidroxibutiril coenzima-A (3HBCoA) obtendo-se assim o monômero.⁷ Este é incorporado a cadeia polimérica pela ação da PHB polimerase.

É importante destacar que a reação de obtenção do 3HBCoA é dependente de NADPH (Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo, forma reduzida), e esta necessita da regeneração de NADP/NADPH. São considerados 3 candidatos



Oktober Fórum 2005 – PPGEQ

para a reação bioquímica de regeneração de NADPH: (a) glicose-6-hidrogenase; (b) 6-fosfogluconato desidrogenase e (c) isocitrato desidrogenase no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). O primeiro é na rota metabólica Entner-Doudoroff e o primeiro e o segundo no ciclo pentose-fosfato. As enzimas (a) e ou (a) e (b) são mais comuns quando a fonte de carbono é um carboidrato, quando se tem álcoois, ácidos orgânicos, alcanos entre outros a enzima preferida é a (c).⁷

A Figura 2, mostra a rota metabólica Entner-Doudoroff.

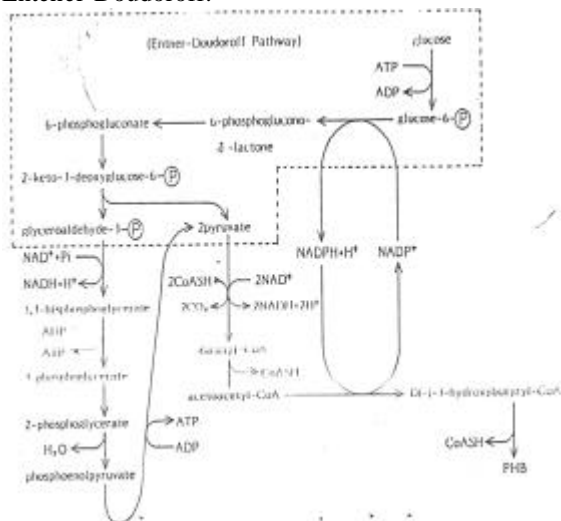


Figura 2: Rota metabólica utilizada para produção do PHB. (Yemane, 1993)

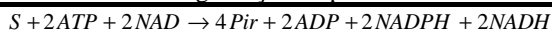
Ho-Hong et al estudaram o metabolismo da *E. coli* recombinante crescendo em glicose, através da análise de fluxo metabólico, verificaram que o fluxo intracelular é reorientado para a síntese de PHB e torna-se maior quanto maior biomassa acumulada. O Fluxo da rota metabólica Entner-Doudoroff aumenta durante a produção evidenciando o envolvimento com a síntese de PHB.

A degradação do P(3HB) é iniciada pela enzima P(3HB) depolimerase e forma o ácido 3-hidroxibutírico. Este é oxidado a acetoacetato pela ação desidrogenase NAD-específica e depois convertido a acetoacetyl coenzima A.⁸ A conversão da acetoacetyl-CoA em acetyl-CoA se dá pela ação da Cetotiolase.⁶ Por motivo de simplificação do modelo na degradação do polímero foi considerado obtenção direta do AcCoA a partir do ac3HB.

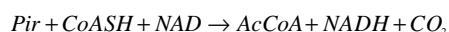
Kawaguchi and Doi fizeram experimentos com a *Alcaligenes eutrophus* crescendo em glicose ou ácido butírico. Eles deixavam baixar a concentração de substrato e depois tornavam a adicionar em forma de pulso, e verificaram que quando não tinha mais frutose iniciava-se a degradação e quando se adicionava voltava a crescer o peso molecular.

A seguir pode ser observado o mecanismo de reação para obtenção do PHB. Para o mecanismo de regulação foi considerado inibição da depolimerização enquanto há piruvato disponível, assim enquanto houver fonte de carbono externo, haverá formação de piruvato e não ocorrerá degradação de polímero.

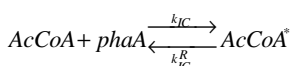
Formação do piruvato:



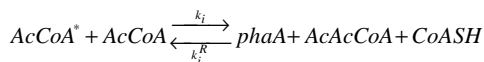
Formação da Acetil-coenzima-A



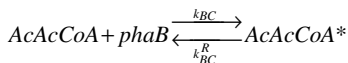
Formação do complexo



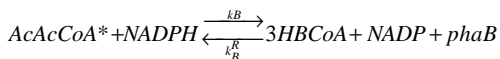
3-Cetotiolase e Aceto-CoA



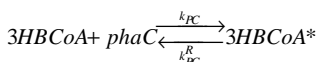
Formação da Aceto-acetyl-coenzima -A



Formação do complexo



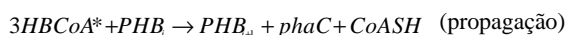
Acetoacetyl-CoA redutase e Aceto-acetyl-CoA



Formação do 3-Hidroxibutiril-coenzima -A



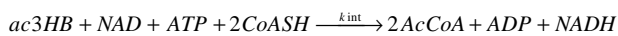
Formação do complexo



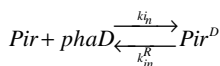
Acetoacetyl-CoA redutase e Aceto-acetyl-CoA



Polimerização



Depolimerização



Mecanismo de regulação



Oktober Fórum 2005 – PPGEQ

10 anos

O modelo a seguir foi proposto por Gambeta et al (2003a e 2003b).

Balço para biomassa (X):

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad \text{e} \quad \mu = \mu_{\max} \cdot \frac{AcCoA}{K_{AcCoA} + AcCoA}$$

onde μ (h^{-1}) é a velocidade de crescimento específica, é utilizado o modelo de monod para o cálculo do μ , modelo clássico para cinética de crescimento microbiano, μ_{\max} é a velocidade específica máxima de crescimento, K_{AcCoA} é a constante de saturação do modelo de monod, $AcCoA$ é a concentração de Acetil-CoA que é o substrato limitante.

Foi adicionada a condição baseada na formação de biomassa.¹³

$\mu = 0$ quando $NAD=0$ ou $NADP=0$.

Balço para Sacarose (S):

$$\frac{dS}{dt} = -q_s \cdot X \quad \text{e} \quad q_s = (a_1 \cdot \mu + b_1) \cdot S$$

Onde q_s é baseada na equação de Luedeking e Piret (1959), α_1 e β_1 são parâmetros do modelo que representam o consumo do substrato associado ao crescimento e não associado respectivamente. A equação foi modificada para considerar a quantidade de substrato disponível.

É adicionada a condição de que $q_s=0$ se $ADP=0$, isto é, não a consumo de substrato.

Balço para Piruvato (Pir):

$$\frac{dPir}{dt} = (4q_s - q_p) \cdot X - k_{in} \cdot Pir \cdot phaD + k_{in}^R \cdot Pir^D \quad \text{e} \quad q_p = (a_2 \cdot \mu + b_2) \cdot \frac{Pir \cdot CoASH}{0.0032}$$

Da mesma forma, foi utilizada a equação de Luedeking e Piret, modificada para considerar as quantidades de piruvato e Coenzima -A disponíveis no meio. Foi adicionada a condição de $q_p=0$ quando $NAD=0$.

Balço de massa para Acetil-CoA (AcCoA):

$$\frac{d(AcCoA)}{dt} = q_p \cdot X - \frac{\mu \cdot X}{Y_{XS}} - k_{IC} \cdot AcCoA \cdot phaA + k_{IC}^R \cdot AcCoA^* + 2 \cdot k_{int} \cdot ac3HB - k_i \cdot AcCoA^* \cdot AcCoA + k_i^R \cdot AcAcCoA \cdot phaA \cdot CoASH$$

Foi adicionada a condição, $\frac{d(AcCoA)}{dt} = 0$ se $CoASH=0$ ou $NAD=0$ ou $ATP=0$.

$$\frac{d(AcCoA^*)}{dt} = k_{IC} \cdot AcCoA \cdot phaA - k_{IC}^R \cdot AcCoA^* - k_i \cdot AcCoA^* \cdot AcCoA + k_i^R \cdot AcAcCoA \cdot phaA \cdot CoASH$$

Balço para Acetoacetyl-CoA (AcAcCoA):

$$\frac{d(AcAcCoA)}{dt} = k_i \cdot AcCoA^* \cdot AcCoA - k_i^R \cdot AcAcCoA \cdot phaA \cdot CoASH - k_{BC} \cdot AcAcCoA \cdot phaB + k_{BC}^R \cdot AcAcCoA^*$$

$$\frac{d(AcAcCoA^*)}{dt} = k_{BC} \cdot AcAcCoA \cdot phaB - k_{BC}^R \cdot AcAcCoA^* - k_B \cdot AcAcCoA^* \cdot NADPH + k_B^R \cdot 3HBCoA \cdot NADP \cdot phaB$$

Balço para 3-hidroxi-butiril-CoA (3HBCoA):

$$\frac{d(3HBCoA)}{dt} = k_B \cdot AcAcCoA^* \cdot NADPH - k_B^R \cdot 3HBCoA \cdot NADP \cdot phaB - k_{PC} \cdot 3HBCoA \cdot phaC + k_{PC}^R \cdot 3HBCoA^*$$

$$\frac{d(3HBCoA^*)}{dt} = k_{PC} \cdot 3HBCoA \cdot phaC - k_{PC}^R \cdot 3HBCoA^* - k_{PI} \cdot 3HBCoA^* - k_P \cdot 3HBCoA^* \cdot \sum_{i=1}^{\infty} PHB_i$$

Balço para complexo piruvato-PHBdepolimerase (Pir^D):

$$\frac{d(Pir^D)}{dt} = k_{in} \cdot Pir \cdot phaD - k_{in}^R \cdot Pir^D$$



Oktober Fórum 2005 – PPGEQ

10 anos

Balço para o Polihidroxibutirato (PHB):

$$\frac{d(PHB)}{dt} = 3HBCoA^* \cdot (k_{p1} \cdot d(i) + k_p(PHB_{i-1} - PHB_i)) + k_d \cdot (PHB_{i+1} - PHB_i)$$

Balço para o acido 3-hidroxi-butírico(ac3HB):

$$\frac{d(ac3HB)}{dt} = k_d \cdot phaD \cdot \sum_{i=1}^{\infty} PHB_i - k_{int} \cdot ac3HB$$

Balço para a enzima 3-Cetotiolase (phaA):

$$\frac{d(phaA)}{dt} = -k_{ic} \cdot AcCoA \cdot phaA + K_{ic}^R \cdot AcCoA^* + k_i \cdot AcCoA^* \cdot AcCoA - r_i^R \cdot AcAcCoA \cdot phaA \cdot CoASH$$

Balço para a enzima Acetoacetyl-CoA redutase (phaB):

$$\frac{d(phaB)}{dt} = -k_{bc} \cdot AcAcCoA \cdot phaB + K_{bc}^R \cdot AcAcCoA^* + k_b \cdot AcAcCoA^* \cdot NADPH - r_b^R \cdot 3HBCoA \cdot NADP \cdot phaB$$

Balço para a enzima poli(3-hidroxibutirato) sintase (phaC):

$$\frac{d(phaC)}{dt} = -k_{pc} \cdot 3HBCoA \cdot phaC + K_{pc}^R \cdot 3HBCoA^* + k_{p1} \cdot 3HBCoA^* + r_p \cdot 3HBCoA \sum_{i=1}^{\infty} PHB_i$$

Balço para a enzima PHB depolimerase (phaD):

$$\frac{d(phaD)}{dt} = -k_{in} \cdot Pir \cdot phaD + k_{in}^R \cdot Pir^D$$

Balço para o cofator coenzima-A (CoASH):

$$\frac{d(CoASH)}{dt} = \frac{m \cdot X}{Y_{XS}} - q_p \cdot X + k_i \cdot AcCoA^* \cdot AcCoA - k_i^R \cdot AcAcCoA \cdot phaA \cdot CoASH + k_1 \cdot 3HBCoA^* + r_p \cdot 3HBCoA \sum_{i=1}^{\infty} PHB_i - 2 \cdot k_{int} \cdot ac3HB$$

Balço para Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo, forma reduzida (NADPH):

$$\frac{d(NADPH)}{dt} = 2 \cdot q_s \cdot X + \frac{m \cdot X}{Y_{XS}} - k_b \cdot AcAcCoA^* \cdot NADPH + k_b^R \cdot 3HBCoA \cdot NADP \cdot phaB$$

Balço para Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADP):

$$\frac{d(NADP)}{dt} = -2 \cdot q_s \cdot X - \frac{m \cdot X}{Y_{XS}} + k_b \cdot AcAcCoA^* \cdot NADPH - k_b^R \cdot 3HBCoA \cdot NADP \cdot phaB$$

Balço para trifosfato de adenosina (ATP):

$$\frac{d(ATP)}{dt} = 2 \cdot q_s \cdot X - k_{int} \cdot ac3HB$$

Balço para trifosfato de adenosina (ATP):

$$\frac{d(ADP)}{dt} = -2 \cdot q_s \cdot X + k_{int} \cdot ac3HB$$

Balço para Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo, forma reduzida (NADH):

$$\frac{d(NADH)}{dt} = 2 \cdot q_s \cdot X - q_p \cdot X + k_{int} \cdot ac3HB$$

Balço para Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD):

$$\frac{d(NAD)}{dt} = -2 \cdot q_s \cdot X + q_p \cdot X - k_{int} \cdot ac3HB$$



Oktober Fórum 2005 – PPGEQ

Na Figura 1 é mostrado a simulação do modelo estruturado, este foi implementado no simulador EMSO.

Os resultados estão coerentes com o processo de polimerização/depolimerização, isto é, enquanto tem fonte de carbono (Sacarose) ocorre a formação do PHB, quando acaba esta fonte ocorre um período de adaptação e em seguida o polímero é consumido como fonte de matéria prima, então a biomassa volta a crescer.

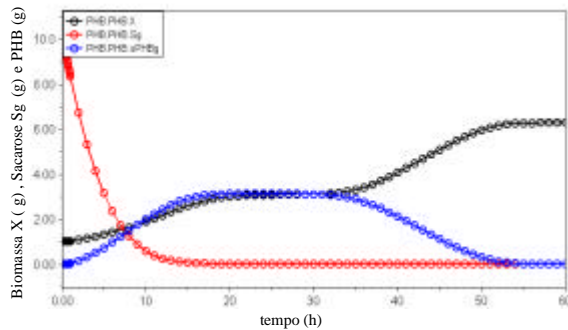


Figura1: Simulação de um cultivo em batelada.

Modelo Não Estruturado: O modelo não estruturado utiliza balanços de massa e cinética de crescimento microbiano, consumo de substrato, formação de produtos, mas sem utilizar metabólitos internos da célula. É um tipo de modelo bem simplificado e eficiente para casos onde não justifica complicar o modelo se não se tem interesse em um produto interno.

O modelo a seguir foi desenvolvido por Rajee et al.

Balanço para a Biomassa (X):

$$X = R + P$$

Considera a formação de biomassa sendo uma parte polímero e o resto da célula (parede celular, DNA, etc).

Balanço para a Biomassa residual (R):

$$\frac{d(R)}{dt} = \mu \cdot R$$

Onde μ é dado pela equação abaixo onde considera a soma do modelo de monod e um modelo sigmoidal, multiplicado por um fator de inibição para o caso onde não tenha mais Frutose (S_F) e ou Nitrogênio (S_N) no meio.

$$\mu = \left(\mu_1 \cdot \frac{S_N}{K_{S1} + S_N} + \mu_2 \cdot \frac{\left(\frac{S_N}{K_{S2}}\right)^n}{1 + \left(\frac{S_N}{K_{S2}}\right)^n} \right) \cdot \left(1 - \frac{(S_N/S_F)^m}{S_M} \right)$$

Balanço para Frutose (S_F):

$$\frac{d(S_F)}{dt} = - \left(a \cdot \frac{dR}{dt} + b \cdot \frac{dP}{dt} + c \cdot R \right)$$

Onde a, b e c são parâmetros do modelo que descrevem a dependência do consumo da frutose com a formação de biomassa residual, formação de polímero e manutenção das células.

Balanço para Nitrogenio (S_N):

$$\frac{d(S_N)}{dt} = -d \cdot \frac{dR}{dt}$$

Balanço para o P3HB (P):

$$\frac{d(P)}{dt} = (k_1 \cdot (R - R_{\min}) - k_2 \cdot P) \cdot \frac{K_S}{K_S + S_N} + e \cdot \frac{dR}{dt}$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

De posse dos experimentos, é possível estimar os parâmetros de ambos os modelos e comparar qual deles será o melhor. Os dois foram implementados no software EMSO, mas ainda não foi estimado os parâmetros.

Assim que forem realizados os experimentos, poderão ser feitas modificações nos modelos a fim de prever algumas propriedades reológicas finais, além de equações como consumo de nitrogênio no modelo estruturado e modelo para batelada alimentada, por exemplo.

4 CONCLUSÕES

O modelo estruturado mostra resultados de simulação coerentes. Assim que realizarmos experimentos poderemos comparar os modelos.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ

REFERÊNCIAS

1. STEINBÜCHEL, Alexander. Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example. **Macromolecular Bioscience**, v.1, n.1, p.1-23.2001
2. STEINBÜCHEL, Alexander; EVERSLOH, Tina L. Metabolic engineering ad pathway



Oktober Fórum 2005 – PPGEQ

- construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, n.16, p.81-96.2003
- LEE, Sang Yup. Plastic Bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate productions in bactéria. **Tibtech**, v.14, p.431-438. 1996
 - ANDERSON, Alistar J. and DAWES, Edwin A. Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. **Microbiological Reviews**, v.54, n.4, p.450-472. 1990
 - MAEKAWA, Baku; KOYAMA, Naoyuki and DOI Yoshiharu. Purification and Properties of 3-Ketothiolase from *Alcaligenes latus*. **Biotechnology Letters**, V.15, n.7, p. 691-696. 1993.
 - KIM, Tae-Woo; PARK, Jin-Seo and LEE, Yong-Hyun. Enzymatic Characteristics of Biosynthesis and Degradation of Poly- β -hydroxybutyrate of *Alcaligenes latus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.6, n.6, p. 425-431. 1996
 - YEMANE, Tsuneo. Yield of Poly-D(-)-3-Hydroxybutyrate from Various Carbon Sources: A teorical Study. **Biotechnology and Bioengineering**, v.41, p. 165-170. 1993
 - KAWAGUCHI, Ysushi and DOI, Yoshiharu. Kinetics and Mechanism of Synthesis and Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate). **Macromolecules**, v.25, p. 2324-2329. 1992.
 - WANG, Fulai and LEE, Sang Yup. Poly(3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Batch Culture of *Alcaligenes latus* under Nitrogen Limitation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n. 9, p. 3703-3706. 1997.
 - DHANASEKAR, R; VIRUTHAGIRI, T. and SABARATHINAM, P.L. Poly(3-hydroxybutyrate) Synthesis from a mutant strain *Azotobacter vinelandii* utilizing glucose in a batch reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 1-8. 2003.
 - GOMBERT, Andreas Karoly and NIELSEN, Jens. Mathematical modeling of metabolism. **Current opinion in Biotechnology**, v. 11, p. 180-186.2000.
 - RIIS, V. and MAI, W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. **Journal of Chromatography**, v.445, p. 285-289. 1988.
 - LEAF, Timothy A. and SRIENC, Friedrich. Metabolic Modeling of Polyhydroxybutyrate Biosynthesis. **Biotechnology and Bioengineering**, v.57, n. 5, p. 557-570. 1998
 - RAJE, Poonam and SRIVASTAVA, Ashok K. Update mathematical model and fed-batch strategies for poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by *Alcaligenes eutrophus*. **Bioresource Technology**, V. 54, p. 185-192. 1998.
 - GAMBETTA, R.; FINKLER, L.; PINTO, J. C.; e ALVES, T. L. M. Interpretação Mecanística da Rota Metabólica de Produção de Poli((R)-3-hidróxi-butirato) com Auxílio de Modelos Matemáticos de Distribuição de Pesos Moleculares, **Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações**, Florianópolis, SC, Brasil. 2003a.
 - GAMBETTA, R.; FINKLER, L.; ALVES, T. L. M.; e PINTO, J. C. Interpretação Mecanística da Rota Metabólica de Produção de Poli((R)-3-Hidroxi-Butirato) com Auxílio de Modelos Matemáticos de Distribuição de Pesos Moleculares. **Anais do 7º Congresso Brasileiro de Polímeros**, Belo Horizonte, 2003b.