

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS
MISSÕES - URI ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RAFAELA NERY DE MELO

PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO (P(3HB)) POR *Bacillus
megaterium* ATCC 14581 EM BIORREATOR BATELADA
ALIMENTADA

ERECHIM, RS - BRASIL

MARÇO, 2021

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS
MISSÕES - URI ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

RAFAELA NERY DE MELO

**PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO (P(3HB)) POR *Bacillus
megaterium* ATCC 14581 EM BIORREATOR BATELADA
ALIMENTADA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos da URI Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

ERECHIM, RS - BRASIL

MARÇO, 2021

RAFAELA NERY DE MELO

PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO (P(3HB)) POR *Bacillus megaterium* ATCC 14581 EM BIORREATOR BATELADA ALIMENTADA

Dissertação apresentada como quesito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

Erechim, 26 de março de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Eunice Valduga
URI Erechim

Prof. Dr. Alexander Junges
URI Erechim

Dr^a. Shana Paula Segala Miotto
IFRS Campus Bento Gonçalves

Prof^a. Dr^a. Geciane Toniazzo Backes
URI Erechim

2021.

M528p Melo, Rafaela Nery de
Produção de polihidroxibutirato (P (3HB)) por *Bacillus megaterium*
ATCC 14581 em biorreator batelada alimentada / Rafaela Nery de Melo. –

73 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Regional Integrada do Alto
Uruguai e das Missões, Erechim, 2021.

“Orientação: Prof^a Dra Eunice Valduga, Prof. Dr. Alexander Junges.”

1. Efluente - indústria de balas 2. Biopolímero 3. Parâmetros cinéticos
I. Título

C.D.U.: 664

Catálogo na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

Dedico ao meu pai Jarbas, à
minha mãe Gilvana e à minha irmã
Júlia, por todo o apoio, incentivo e
amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter sido minha fonte de luz e ter estado sempre presente em minha mente independente dos altos e baixos durante toda essa jornada.

Agradeço em especial toda a minha família, a qual sempre fez de tudo para que eu atingisse esse objetivo. À minha mãe, Gilvana, por ter sido sempre tão carinhosa, companheira e compreensível comigo, mesmo estando longe. Ao meu pai, Jarbas, por sempre ter me apoiado e ter me feito acreditar que no final tudo daria certo. A minha irmã, Júlia, por sempre me transmitir palavras carinhosas e positivas.

Agradeço ao meu namorado, Júnior, o qual sempre me apoiou durante os maiores desafios que enfrentei, que teve muita paciência em me ouvir reclamar das coisas e que através de suas palavras me incentivou a persistir os meus sonhos.

À minha cachorra Luna, que fez com que os períodos mais estressantes fossem amenizados através de brincadeiras, carinhos e lambidas.

Aos demais familiares e amigos pelo incentivo, compreensão, amizade e por contribuírem para que meu coração se sentisse sempre rodeado de amor e carinho.

Agradeço à URI – Campus de Erechim, por fornecer a estrutura física e profissional necessária para que o projeto fosse desenvolvido com excelência.

Agradeço à minha orientadora, Eunice Valduga, por ter sido tão prestativa nas vezes que precisei e por compartilhar ideias e conhecimento para que atingíssemos os melhores resultados. Agradeço também o meu co-orientador, Alexander Junges, por todos os ensinamentos, não só técnicos, de forma descontraída e amena.

Agradeço a todos os colegas de laboratório, pela troca de conhecimento e ajuda quando solicitada. Em especial ao Guilherme Hassemer e a Rosicler Colet, que desde o primeiro instante estiveram dispostos a ensinar as metodologias, bem como a solucionar problemas os quais eu tinha dificuldade, por fornecer uma bagagem gigante de conhecimento e por tornarem os momentos no laboratório mais descontraídos e leves. Enfim, foram literalmente anjos durante todo o desenvolvimento do projeto.

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu.
Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que
pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os
pensamentos”.

(Paulo Baleki)

Resumo

A busca por materiais alternativos que apresentem características semelhantes aos polímeros vem ganhando cada vez mais espaço, e uma das possibilidades é a produção de biopolímeros como os polihidroxicarboxilatos (PHAs), como o poli(3-hidroxiobutirato) - (P(3HB)). Neste contexto, o objetivo deste estudo foi produzir (P(3HB)) por *Bacillus megaterium* ATCC 14581 em biorreator sistema batelada alimentada, a 30°C, 500 rpm e 4vvm, com meio mineral adicionado de sacarose comercial e água de parboilização de arroz – APA e/ou adicionado de efluente da indústria de balas (EIB) e APA. A máxima produção celular foi de 3,90 g·L⁻¹ e 2,87g L⁻¹ de P(3HB) (74,2%, m/m) para o meio a base de sacarose comercial e APA e 5,80 g·L⁻¹ de biomassa total e 2,85 g·L⁻¹ de P(3HB) (49,1%, m/m) para o meio utilizando coprodutos agroindustriais (EIB e APA), ambos em 24 h de cultivo. A máxima produtividade foi de 0,15 g L⁻¹·h⁻¹ após 9 h de cultivo em meio com sacarose e de 0,22 g·L⁻¹·h⁻¹ após 12 h em meio com coprodutos. Ao que se refere as conversões em produto e célula obteve-se o maior fator de conversão de sacarose em P(3HB) de 0,19 g g⁻¹ em 24 h, glicose de 0,31 g g⁻¹ em 12 h e do nitrogênio de 2,15 g g⁻¹ em 24 h. Para conversão em células um comportamento semelhante foi observado tanto para glicose quanto para nitrogênio, onde a maior conversão de destes substratos em célula foi de 0,54 g g⁻¹ em 12 h e 2,97 g g⁻¹ em 24 h de cultivo, respectivamente. No entanto, a sacarose foi convertida em célula (0,27 g g⁻¹) em um menor tempo (12 h). Ao utilizar meio composto por EIB e APA houve um incremento de 32% na produtividade global de P(3HB) e maior conversão de célula em produto, quando comparado a fonte de carbono a base de sacarose comercial. As velocidades específicas de crescimento global (0,33 h⁻¹ e 0,27 h⁻¹) e de produtividade global em células (0,26 g L⁻¹ h⁻¹ em 9 h e 0,28 g L⁻¹ h⁻¹) foram similares para os substratos a base de sacarose comercial e com coprodutos agroindustriais. Os efluentes das indústrias de balas, confeitos e/ou de parboilização de arroz podem ser empregados na produção de P(3HB) por *B. megaterium* levando a redução de custo de aproximadamente R\$ 3,00 por litro de meio de cultivo utilizado na produção do biopolímero.

Palavras-chave: Biopolímero, água de parboilização de arroz, efluente da indústria de balas, biopolímero, parâmetros cinéticos.

Abstract

The search for alternative materials that have characteristics similar to polymers is gaining more and more space, and one of the possibilities is the production of biopolymers such as polyhydroxyalkanoates (PHAs), such as poly (3-hydroxybutyrate) - (P (3HB)). In this context, the objective of this study was to produce (P (3HB)) by *Bacillus megaterium* ATCC 14581 in a batch fed system bioreactor, at 30°C, 500 rpm and 4vvm, with mineral medium added with commercial sucrose and rice parboiling water - APA and / or added bullet industry effluent (EIB) and APA. The maximum cell production was 3,90 g·L⁻¹ and 2,87 g L⁻¹ of P (3HB) (74,2%, w/w) for the medium based on commercial sucrose and APA and 5,80 g·L⁻¹ of total biomass and 2,85 g· L⁻¹ of P (3HB) (49,1%, w/w) for the medium using agro-industrial by-products (EIB and APA), both in 24 h of cultivation. The maximum productivity was 0,15 g L⁻¹·h⁻¹ after 9 h of culture in medium with sucrose and 0,22 g·L⁻¹·h⁻¹ after 12 h in medium with co-products. With regard to product and cell conversions, the highest sucrose to P (3HB) conversion factor was obtained at 0,19 g g⁻¹ in 24 h, glucose 0,31 g g⁻¹ in 12 h and nitrogen of 2,15 g g⁻¹ in 24 h. For cell conversion, a similar behavior was observed for both glucose and nitrogen, where the greatest conversion of these substrates into cells was 0,54 g g⁻¹ in 12 h and 2,97 g g⁻¹ in 24 h of culture, respectively. However, sucrose was converted into a cell (0,27 g g⁻¹) in a shorter time (12 h). When using medium composed of EIB and APA, there was an increase of 32% in the global productivity of P (3HB) and greater conversion of cell to product, when compared to a carbon source based on commercial sucrose. The specific speeds of global growth (0,33 h⁻¹ and 0,27 h⁻¹) and of global productivity in cells (0,26 g L⁻¹ h⁻¹ in 9 h and 0,28 g L⁻¹ h⁻¹) were similar for substrates based on commercial sucrose and with agro-industrial by-products. The effluents from the candy, confectionery and / or rice parboiling industries can be used in the production of P (3HB) by *B. megaterium* leading to a cost reduction of approximately R \$ 3.00 per liter of culture medium used in the production of the biopolymer.

Keywords: Biopolymer rice parboiling water, bullet industry effluent, kinetic parameters.

Lista de Figuras

Figura 1 - Classificação dos polímeros.	20
Figura 2- Estrutura geral dos polihidroxicanoatos.	22
Figura 3- Morfologia do grânulo de P(3HB).....	24
Figura 4- Esquema de rotas metabólicas para a produção de PHAs de cadeia curta.	24
Figura 5- Esquema do metabolismo para produção de PHAs de cadeia média 25	25
Figura 6- Aplicações de PHA na medicina e nas indústrias.	26
Figura 7- Estrutura química do polihidroxibutirato 29	29
Figura 8- Grânulos de P(3HB) em <i>B. megaterium</i> após 4 h (a), 12 h (b) e 21 h (c) obtidos através de microscopia eletrônica de transmissão (TEM). As setas indicam fraturas na parede celular devido ao tamanho dos grânulos de P(3HB).	30
Figura 9- Fluxograma do processo de bioprodução de P(3HB).	37
Figura 10- Aspecto geral da Unidade de bioprodução de P(3HB) em Biorreator: a – Banho termostático; b – Frasco de vidro e sistema de controle; c- Controlador de aeração.	40
Figura 11- Separação de fases de diferentes amostras. Controle negativo (A), amostras com células (B e C).	46
Figura 12- Cinética de bioprodução de P(3HB) e biomassa (g L ⁻¹ e %) em meio de cultivo composto por sacarose comercial (60 %) e APA (40 %).	48
Figura 13- Cinética de bioprodução de P(3HB) e biomassa (g L ⁻¹ e %) em meio de cultivo composto por EIB (60 %) e APA (40 %).	49
Figura 14- Produtividade global de P(3HB) e cinética da conversão de célula em P(3HB) ($Y_{P/X}$) ao longo da bioprodução em biorreator batelada alimentada com por 60% de sacarose comercial e 40% de APA (A) e por 60% de EIB e 40% de APA (B) 53	53
Figura 15- Cinética da conversão de nitrogênio, sacarose e glicose em produto (A) e célula (B) utilizando substrato a base de sacarose comercial e água de parboilização de arroz.	54
Figura 16- Cinética da conversão de nitrogênio, sacarose e glicose em produto (A) e célula (B) utilizando substrato a base de coprodutos agroindustriais (EIB+APA).	55
Figura 17- Curva de calibração sacarose.....	72
Figura 18- Curva de calibração glicose.....	72

Lista de Tabelas

Tabela 1- Visão geral de algumas estratégias de produção e recuperação de PHAs por via microbiana	28
Tabela 2- Características físico-químicas do polihidroxibutirato (PHB) e do polipropileno (PP).....	31
Tabela 3- Composição do meio mineral.....	38
Tabela 4- Composição da solução de micronutrientes.....	38
Tabela 5- Concentração de nitrogênio total (NT), carbono orgânico total (COT) e densidade dos coprodutos agroindustriais	47
Tabela 6-Parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioprodução de P(3HB) por <i>B. megaterium</i> em biorreator do sistema batelada alimentada utilizando sacarose comercial e coprodutos agroindustriais.	Erro! Indicador não definido.

Lista de Abreviações

3HA-CoAs	3-hidroxiacil-CoAs
3HB-CoA	(R)-3-hidroxiabutiril coenzima A
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
HA-CoAs	Hidroxiacil-CoAs
EIB	Efluente da indústria de balas e confeitos
APA	Água de parboilização de arroz
PHA	Polihidroxialcanoatos
P(3HB)	Polihidroxiabutirato
$Y_{P/Ss}$	Fator de conversão de sacarose global em P(3HB)
$Y_{P/Sg}$	Fator de conversão de glicose global em P(3HB)
$Y_{P/Sn}$	Fator de conversão de nitrogênio global em P(3HB)
$Y_{X/Ss}$	Fator de conversão de sacarose global em células
$Y_{X/Sg}$	Fator de conversão de glicose global em células
$Y_{X/Sn}$	Fator de conversão de nitrogênio global em células
NT	Nitrogênio total
t_i	Tempo inicial

Sumário

1	Introdução.....	14
2	Objetivos.....	16
3	Revisão bibliográfica.....	17
3.1	Polímeros.....	17
3.1.1	Polímeros naturais.....	17
3.1.2	Polímeros biodegradáveis.....	18
3.2	Polihidroxialcanoatos.....	21
3.2.1	Polihidroxibutirato.....	29
3.3	<i>Bacillus megaterium</i>	31
3.4	Uso de coprodutos da indústria de alimentos para a síntese de PHAs32	
3.5	Sistemas de bioprodução de P(3HB).....	34
3.6	Recuperação de biopolímeros.....	35
4	Materiais e métodos.....	37
4.1	Microrganismo.....	38
4.2	Caracterização dos Coprodutos.....	38
4.3	Bioprodução de P(3HB).....	39
4.3.1	Ativação do microrganismo.....	39
4.3.2	Pré-inóculo e meios meios de cultura.....	39
4.4	Produção de P(3HB) em biorreator batelada alimentada.....	40
4.5	Parâmetros cinéticos e estequiométricos da produção de P(3HB).....	41
4.5.1	Velocidades instantâneas e específicas globais.....	41
4.5.2	Fatores de conversão global.....	42
4.5.3	Produtividade global.....	43
4.6	Metodologia Analítica.....	43
4.6.1	Nitrogênio total.....	43
4.6.2	Açúcares redutores e não-redutores.....	44
4.6.3	Densidade.....	44
4.6.4	Carbono orgânico e nitrogênio total.....	45
4.6.5	Biomassa total.....	45
4.6.6	Recuperação de P(3HB) via extração química.....	45
4.6.7	Quantificação de P(3HB).....	46
4.7	Análise estatística dos resultados.....	46
5	Resultados e discussões.....	47
5.1	Caracterização dos coprodutos agroindustriais.....	47

5.2	Cinética da produção de P(3HB) em biorreator batelada alimentada .	48
5.2.1	Cultivo com fonte de carbono sintética	48
5.2.2	Cultivo com coprodutos agroindustriais	49
5.3	Parâmetros cinéticos e estequiométricos da produção de P(3HB) em biorreator batelada alimentada	51
6	Conclusão.....	60
7.	Sugestões de trabalhos futuros.....	60
8.	Referências.....	61
9.	Apêndice I.....	72

1 Introdução

A utilização de polímeros é de grande importância para os diferentes segmentos (industriais e/ou residenciais). Embora possuam um amplo leque de utilidades, acabam acarretando problemas que muitas vezes passam despercebidos. Exemplo disso é o acúmulo de lixo no meio ambiente, seja ele terrestre ou aquático. O crescimento populacional, a falta de conscientização, políticas mais severas no que diz respeito a coleta seletiva e a ausência muitas vezes de um destino correto para todo esse resíduo gerado, contribui significativamente para a realidade em que vivemos.

De acordo com a *World Wide Fund for Nature* (WWF, 2019), cerca de metade do plástico que polui o mundo hoje foi desenvolvido após os anos 2000 e, mesmo se tratando de um problema recente, 75% de todo o plástico produzido na história já foi descartado. Em consequência da má gestão dos resíduos, a estimativa é de que um terço deste plástico descartado tenha se inserido na natureza como poluição terrestre, de água doce ou marinha. A estimativa é de que até 2030 a poluição por plástico dobre, sendo os oceanos os mais afetados, permanecendo neles mais de nove milhões de toneladas métricas ao ano, considerando que o consumo dos produtos é maior que a capacidade de tratamento dos resíduos.

A produção anual de plástico aumentou de 2 milhões de toneladas métricas, em 1950, para 400 milhões de toneladas métricas, em 2015, resultando no destino dos resíduos gerados pela produção abundante de plástico. Das 6,3 bilhões de toneladas de lixo plástico produzidas de 1950 até 2015, apenas 9% foram reciclados (SOARES, 2017).

No Brasil, aproximadamente 11,3 milhões de toneladas de lixo plástico são produzidos por ano, fazendo com que ocupe a 4^o posição no *ranking* mundial. Deste total, apenas 1,28% é efetivamente reciclado, sendo um dos menores índices da pesquisa e estando muito abaixo da média global. Sendo assim, 7,7 milhões de toneladas de plástico são destinadas aos aterros sanitários e outras 2,4 milhões de toneladas são descartadas a céu aberto sem qualquer tipo de tratamento (WWF, 2019).

O tempo de decomposição dos plásticos é de cerca de 400 anos. Essa condição é um dos fatores que está levando a ciência e aumentar as pesquisas

relacionadas aos substituintes ou fontes alternativas dos plásticos convencionais derivados do petróleo. Uma dessas opções são os plásticos biodegradáveis que podem ser produzidos a partir de diversas fontes de matérias-primas, sejam elas vegetais (por exemplo, amido e celulose), animais (por exemplo, quitosana, gelatina e proteína do soro de leite) ou oriundas de produtos de fermentação (por exemplo, os polihidroxialcanoatos).

As fontes de matéria orgânica utilizadas na produção comercial de polihidroxialcanoatos (PHAs) apresentam um valor muito expressivo no processo, portanto estes custos devem ser reduzidos para que se torne uma alternativa viável e possível de ser aplicada em larga escala (RODRIGUEZ-PEREZ *et al.*, 2018). A agricultura e as indústrias alimentícias produzem uma abundância de subprodutos adicionais ricos em carbono que podem ser usados para a produção de produtos de valor agregado (KOLLER *et al.*, 2017).

Um dos processos que acaba gerando um grande volume de coprodutos é a parboilização de arroz. O Brasil é um dos maiores produtores de arroz do mundo, produzindo na safra 2019/2020, 10,56 milhões de toneladas. A produção nacional de arroz tem sua maior concentração na Região Sul, responsável por mais de 80% da oferta nacional (CONAB, 2020). Cerca de 4 litros de efluente são gerados para cada quilo de arroz processado. Esse efluente, que é caracterizado como um material líquido resultante do processo de parboilização, é rico em carga orgânica e nutrientes e se não for tratado adequadamente, pode trazer danos aos cursos hídricos onde será lançado (MONDARDO, 2018). O efluente deste processo é rico em fósforo e nitrogênio, possui baixa viscosidade e pH ácido (ARAÚJO *et al.*, 2015; MUKHERJEE *et al.*, 2016).

Outra indústria cujos coprodutos poderiam ser empregados na biotecnologia é a de doces e balas. De modo geral, o setor possui grande diversidade de produtos e processos, com 25 empresas atuando no Brasil (ABICAB, 2018). Os principais coprodutos da indústria vêm na forma de efluentes, ricos em gorduras e/ou pigmentos, o que faz com que os mesmos possam causar impactos graves ao meio ambiente caso sejam descartados sem tratamento adequado. Entretanto, a alta demanda química e bioquímica de O₂ em conjunto com o grande volume de efluente gerado torna o tratamento adequado dos efluentes um processo de alto custo (MAQBOOL *et al.*, 2017; PAPADAKI *et al.*, 2018).

Diante de tais problemáticas, o presente estudo visa empregar a técnica de fermentação em batelada alimentada para maximizar a produção de P(3HB) em biorreator, utilizando fontes de carbono mais baratas oriundas da indústria de alimentos (Balas e/ou confeitos e beneficiamento de arroz).

2 Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo geral produzir polihidroxibutirato P(3HB) por *Bacillus megaterium* ATCC 14581 utilizando meio sintético e coprodutos da indústria de alimentos.

Os objetivos específicos podem ser descritos como sendo:

- Avaliar a produção de P(3HB) em biorreator sistema batelada alimentada utilizando meio com fonte de carbono a sacarose comercial;
- Realizar a produção de P(3HB) em biorreator sistema batelada alimentada empregando coprodutos agroindustriais (água de parboilização de arroz e efluente da indústria de balas);
- Obter os parâmetros cinéticos e estequiométricos de crescimento e da bioprodução de polihidroxibutirato em meio sintético e agroindustrial do regime batelada alimentada.

3 Revisão bibliográfica

O polihidroxitirato (P(3HB)) foi descoberto primeiramente na década de 1970, sendo que vários estudos foram realizados com o intuito de determinar suas características e prováveis aplicações. Desde modo, definiu-se tópicos que permitirão uma melhor compreensão das características relacionadas a síntese e obtenção do P(3HB). Neste item, serão expostos aspectos gerais dos polímeros, principais produtores e substratos, áreas de utilização, bem como as formas de extração e recuperação.

3.1 Polímeros

A palavra polímero origina-se da combinação dos termos gregos “poli”, que significa “muitos”, e “mero”, cujo significado é de “unidade de repetição”. Assim, a molécula de um polímero pode ser definida como uma macromolécula composta por muitas unidades de repetição (os meros), as quais se encontram unidas entre si por meio de ligações covalentes (CANEVAROLO JUNIOR, 2006).

Os polímeros estão entre os compostos mais abundantes no planeta, sendo encontrados em animais, plantas e microrganismos. A síntese dos polímeros é realizada por reações de polimerização que ocorrem no interior das células (FLIEGER *et al.*, 2003).

Os polímeros podem ser categorizados por seu tamanho, estrutura química, interações moleculares, suas propriedades, e ainda sua origem, podem ser divididos como naturais ou sintéticos (MANO; MENDES, 2004; PAOLI, 2008).

3.1.1 Polímeros naturais

Os polímeros naturais são aqueles provenientes de fontes renováveis, fontes animais ou vegetais, são exemplo a celulose e o colágeno (KABASCI, 2014). São polímeros obtidos via biossíntese de compostos químicos, produzidos via enzimas por organismos vivos (KARLSSON; ALBERTSSON, 1998; PUSKAS; HELFER, 2018).

Como estes compostos são de origem orgânica, os mesmos podem também ser degradados completamente por organismos vivos. A degradação dos polímeros naturais ocorre, sobretudo, devido a ação de enzimas que rompem as

ligações da cadeia polimérica e libera os monômeros que são então utilizados pelas células para realizar suas funções metabólicas gerando, principalmente, água e CO₂ (FLIEGER *et al.*, 2003; KLEMM *et al.*, 2005).

De acordo com Holmes (1985), os polímeros naturais podem ser distribuídos dentro de oito grupos principais: Ácidos nucleicos (Ex.: DNA e RNA); Poliamidas (Ex.: proteínas); Polissacarídeos (Ex.: amido, celulose e glicogênio); Poliésteres orgânicos (Ex.: polihidroxicarboxilatos); Polioésteres (Ex.: polimercaptopropionato); Poliésteres inorgânicos (Ex.: polifosfatos); Poliisoprenóides (Ex.: borracha); Polifenóis (Ex.: taninos).

3.1.2 Polímeros biodegradáveis

Como o próprio nome sugere, essa classe de polímeros engloba todos aqueles que podem ser degradados pela ação de microrganismos vivos e que resultam em biomassa, gás carbônico e água (BRITO *et al.*, 2011). Essa degradação se torna possível devido à existência de grupos funcionais alifáticos nas cadeias desses polímeros, como ésteres e carbonilas. Os polímeros que pertencem a esse grupo podem ser de origem natural renovável, podem ser sintetizados por meio de bactérias, podem ser de origem animal ou ainda aqueles provenientes de fontes fósseis não renováveis (VILLANOVA; ORÉFICE, 2010).

O desenvolvimento de biopolímeros criou uma competição ideal com as contrapartes baseadas em combustíveis fósseis em termos de suas propriedades funcionais e custo de fabricação. Embora o preço envolvido na produção de biopolímeros seja bastante favorável, constantes tentativas estão sendo instiladas para melhorar seu comportamento funcional. Nos últimos tempos, utilizações variáveis de biopolímeros foram realizadas, variando de aditivos e misturas em bioplásticos a higiene pessoal, bens comestíveis e produtos médicos, oferecendo o benefício da degradação ecológica (SADASIVUNI *et al.*, 2019). O uso viável de biopolímeros em diferentes campos depende de sua funcionalidade, que por sua vez depende de fatores como: a quantidade e qualidade/tipo de solvente; a finalidade do biopolímero selecionado, isto é, para emulsão e atividade de superfície de espuma ou para

a viscosidade formando estrutura em massa ou gelificação; o processo de desenvolvimento de estrutura; e sua colaboração com qualquer assunto formulado adicional (WINKWORTH-SMITH; FOSTER, 2013).

Os biopolímeros são produzidos a partir de recursos neutros em carbono compostos em grande parte por biopolímeros, como carboidratos e proteínas, que conferem maior biodegradabilidade em relação aos polímeros sintéticos. Em geral, os polímeros são gerados pela repetição de um bloco de construção, ou seja, um monômero, que consiste em carbono (C), oxigênio (O), hidrogênio (H) e nitrogênio (N) (LACERDA *et al.*, 2014). As propriedades físico-químicas dos polímeros (por exemplo, rigidez, resiliência, condutividade de calor e eletricidade, resistência à corrosão, transparência, cor, *etc.*) são determinadas pelos tipos de monômero, grau de polimerização e padrão/ordem de ligação (KABIR *et al.*, 2020).

Segundo o grau de biodegradabilidade, Khanna e Srivastava (2005) e Pakalapati *et al.* (2018) apontam que os biopolímeros podem ser categorizados em três grupos principais: 1) Polímeros parcialmente biodegradáveis são polímeros produzidos com a adição de amido. Este amido age como ligante, gerando uma mistura homogênea de polímero e amido. Após o descarte, o amido é degradado por microrganismos, porém o restante do composto continuará presente no meio ambiente; 2) Polímeros fotobiodegradáveis possuem aditivos que aumentam a sensibilidade do material à radiação ultravioleta, tornando-o quebradiço quando exposto a este tipo de radiação por períodos prolongados de tempo. Porém, os polímeros fotobiodegradáveis são apenas fragmentados em partículas menores, não havendo quebra nas ligações entre os monômeros que compõem o polímero; 3) Polímeros biodegradáveis completos: são aqueles capazes de sofrer degradação completa, ou seja, ruptura das ligações entre as unidades monoméricas pela ação de enzimas, usualmente secretadas por microrganismos.

Os polímeros biodegradáveis são uma classe dos biopolímeros que vêm sendo pesquisada e utilizada em aplicações biológicas e biomédicas. Estes sofrem degradação por meio da ação de microrganismos de ocorrência natural, como bactérias, fungos e algas. Estes podem ser provenientes de fontes naturais renováveis, sintetizados por bactérias a partir de pequenas moléculas ou derivados de fonte animal. Ainda, existem alguns polímeros biodegradáveis que

podem ser obtidos por meio de fontes fósseis, petróleo ou a partir da mistura entre biomassa e petróleo (BRITO *et al.*, 2011).

Os polímeros completamente biodegradáveis (Figura 1) são classificados em 4 grupos: 1) agropolímeros, que são obtidos geralmente por fracionamento de biomassa a partir de agroprodutos e são divididos em polissacarídeos, proteínas e lipídeos; 2) polímeros sintetizados por microrganismos a partir de fontes renováveis, como é o caso dos polihidroxialcanoatos (PHAs); 3) polímeros sintetizados quimicamente a partir de monômeros derivados de processos biotecnológicos, como por exemplo poli(ácido láctico) (PLA), que pode ser obtido através da polimerização do ácido láctico de microrganismos; 4) polímeros biodegradáveis oriundos de fontes não renováveis sintetizados por processos petroquímicos como por exemplo, policaprolactona (PCL), poliesteramidas (PEA), co-poliésteres alifáticos (PBSA), co-poliésteres aromáticos (PBAT) (AVEROUS; BOQUILLON, 2004).

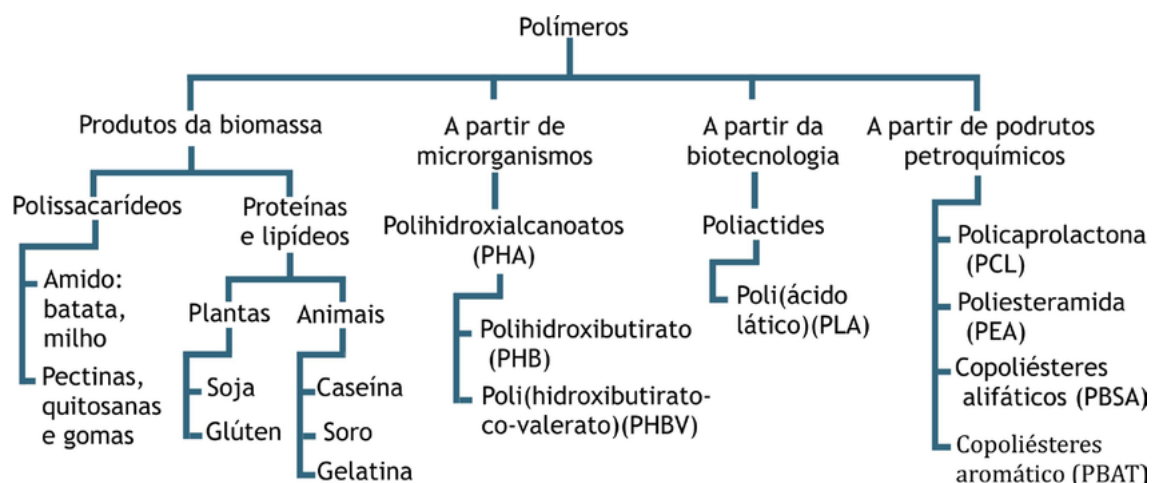


Figura 1 - Classificação dos polímeros. Fonte: Averous e Boquillon (2004)

Embora um material seja potencialmente biodegradável, sua decomposição no ambiente depende de vários fatores, tais como: a forma como esse polímero será descartado, a presença de microrganismos geradores de enzimas específicas para sua decomposição, condições adequadas à atuação microbiana e enzimática, como temperatura, pH, teor de oxigênio no meio, nutrientes, dentre outros (GRAEBLING *et al.*, 1993).

Dentre os principais polímeros biodegradáveis com aplicação industrial, podemos citar o ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), e os

polihidroxicarboxilatos (PHAs) (MIDDLETON; TIPTON, 2000; TANG *et al.*, 2016; THOMAS; BALAKRISHNAN; SREEKALA, 2018).

3.2 Polihidroxicarboxilatos

O polihidroxicarboxilato (PHA) é amplamente reconhecido como bioplástico altamente promissor com a vantagem de biocompatibilidade e biodegradabilidade (PAKALAPATI *et al.*, 2018).

A crescente consciência ambiental e as reservas limitadas de combustível fóssil direcionaram a pesquisa e a atenção industrial para a produção de bioplásticos. Os polihidroxicarboxilatos (PHA) são um tipo de bioplástico produzido a partir de recursos renováveis, são biodegradáveis e também biocompatíveis, ou seja, não produzem subprodutos tóxicos durante seu processo de degradação. Possui alto potencial para substituir os plásticos convencionais. O PHA foi produzido naturalmente por uma série de organismos como um carbono intercelular e reserva de energia por meio de fermentação de cultura pura ou mista (CARDOSO, 2017; MAHENDHRAN *et al.*, 2018; INOUE *et al.*, 2019; TALAN *et al.*, 2020). Seu número por célula e tamanho varia entre os diferentes organismos (CHOI *et al.*, 2020).

No que se refere a obtenção dos PHAs, a forma mais comum é através do uso de microrganismos. Os PHAs são poliésteres termoplásticos produzidos naturalmente e acumulados no citoplasma da célula por mais de 90 gêneros de microrganismos e algumas plantas, como compostos de reserva de carbono sob condições estressantes, como deficiência de nutrientes e também excesso de suprimento de carbono (RATHIKA *et al.*, 2019; TSANG *et al.*, 2019; ARIAS, GARCIA; UGGETTI, 2020; KUMAR; SINGH, 2020). Espécies microbianas como *Cuprividus necator*, *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas oleovorans*, *Alcaligenes* sp., *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterococcus* sp., *Brevundimonas* sp., *Bacillus* sp. e *Escherichia coli* recombinante foram relatados para acumular PHAs (BHUWAL *et al.*, 2014; SOHN *et al.*, 2010; PASSANHA *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2014).

Na literatura são conhecidos mais de 150 monômeros que podem compor os polímeros, tornando possível a copolimerização em diferentes compostos, gerando uma grande diversidade de PHAs com propriedades distintas e,

portanto, com várias aplicações (HASSEMER, 2016; RAZA; ABID; BANAT, 2018). Essa versatilidade mostra o seu potencial em substituição aos polímeros convencionais, principalmente devido a ampla gama de aplicabilidade que podem ser atingidas de acordo com a composição monomérica do polímero formado (CARDOSO, 2017).

Dependendo do comprimento da cadeia, os PHAs podem ser poliéster termoplástico, elastômeros ou mesmo resinas pegajosas compostas por vários ácidos R-hidroxicarboxílicos que podem ser produzidos por vários microrganismos (KOLLER; BRAUNEGG, 2015, ANJUM *et al.*, 2016).

Os PHAs podem ser divididos em três tipos de com base no comprimento da cadeia de carbono: PHAs de comprimento de cadeia curta (scl-PHAs), PHAs de comprimento de cadeia média (mcl-PHAs) e PHAs de comprimento de cadeia longa (lcl-PHAs) (RAZA, ABIT e BANAT, 2018). O scl-PHAs têm entre 3-4 átomos de carbono, tais como poli (3-hidroxiacetato) ou P(3HA), poli (3-hidroxiacetato) ou P(3HA), poli (3-hidroxiacetato) ou P(3HA) e poli (3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato) ou copolímero de PHBV (HAZER; STEINBÜCHEL, 2007). O scl-PHAs pode ser usado em embalagens de alimentos e produtos descartáveis (GRIGORE *et al.*, 2019; JOHNSTON *et al.*, 2018). Os poli-hidroxicarboxilatos com 6–14 átomos de carbono são denominados como PHAs de comprimento de cadeia média, podendo ser homopolímeros como poli (3-hidroxiacetato), simplificados como P(3HA) e poli (3-hidroxiacetato) ou P(3HA) (HAZER; STEINBÜCHEL, 2007). Os homopolímeros dos scl-PHAs ou mcl-PHAs têm propriedades bastante diferentes (MOZEJKO-CIESIELSKA; SZACHERSKA; MARCINIAK, 2019) lcl-PHAs são raros na natureza e são particularmente de menos interesse no processo de desenvolvimento de bioplásticos. A estrutura geral dos PHAs é mostrada na Figura 2.

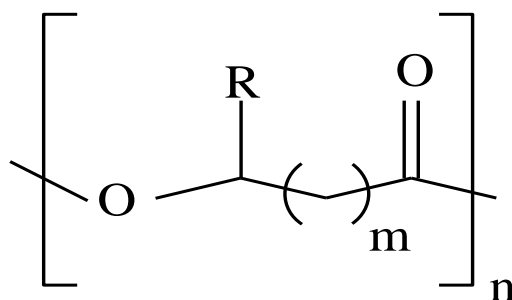


Figura 2- Estrutura geral dos polihidroxicarboxilatos.

As propriedades dos PHAs dependem dos monômeros que constituem o polímero, contudo, de forma geral, são insolúveis em água, possuem tamanho aproximado de 0,2 a 0,5 μm , apresentam configuração *D(-)*, devido à estereoespecificidade da enzima PHA sintase, tem boa resistência a ataques hidrolíticos e a UV, são biocompatíveis, se comportam como materiais piezoelétricos e afundam na água, o que facilita a biodegradação anaeróbica. Além disso, o PHA apresenta moléculas quirais e sua decomposição é basicamente influenciada por três fatores, o tipo e composição do polímero, as condições do ambiente em que está inserido e pelo microrganismo que o produziu (SUDESH; ABE; DOI, 2000; RAZA; ABID; BANAT, 2018).

PHAs são uma classe de polímeros de condensação que atuam como compostos de armazenamento de energia na forma de grânulos intracelulares (Figura 3) com função de reserva de carbono e estão presentes em muitos microrganismos aeróbios e anaeróbios (BALAJI; GOPI; MUTHUVELAN, 2013). Os grânulos de PHA não servem apenas como fonte de carbono e energia, mas também protegem os microrganismos contra o impacto de alta temperatura, estresse osmótico, irradiação UV e espécies reativas de oxigênio (ROS) (KOLLER, 2019).

A superfície do grânulo é composta por uma camada de fosfolípido e proteínas, predominantemente PHAsins, ou seja, uma classe de proteínas capazes de influenciar o número e o tamanho do grânulo. A estereoespecificidade das enzimas biossintéticas são responsáveis pela configuração estereoquímica *S*, característica apresentada por todos os PHAs conhecidos até o momento (KESSLER *et al.*, 2001; POTTER *et al.*, 2002).

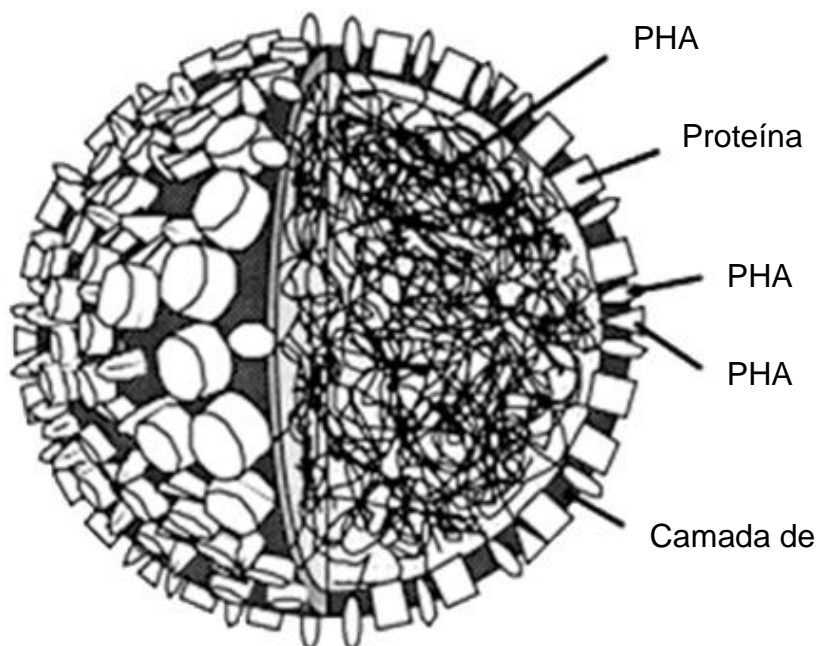


Figura 3- Morfologia do grânulo de P(3HB).

Fonte: ZINN; WITHOLT; EGLI (2001).

Os processos metabólicos que originam os PHAs diversificam também conforme o microrganismo. As Figuras 4 e 5 apresentam um esquema resumido das principais rotas metabólicas para a síntese de PHAs.

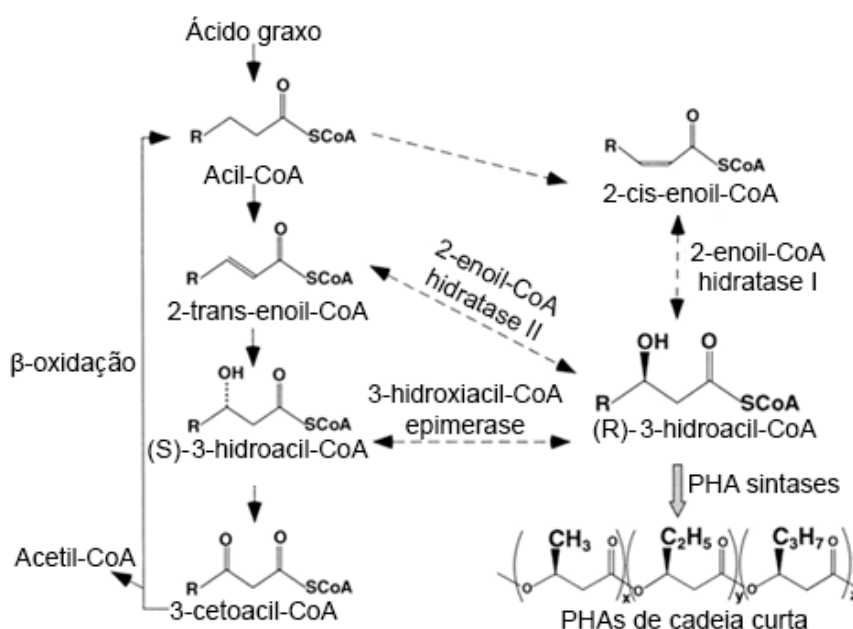


Figura 4- Esquema de rotas metabólicas para a produção de PHAs de cadeia curta. Fonte: ARAI (2002).

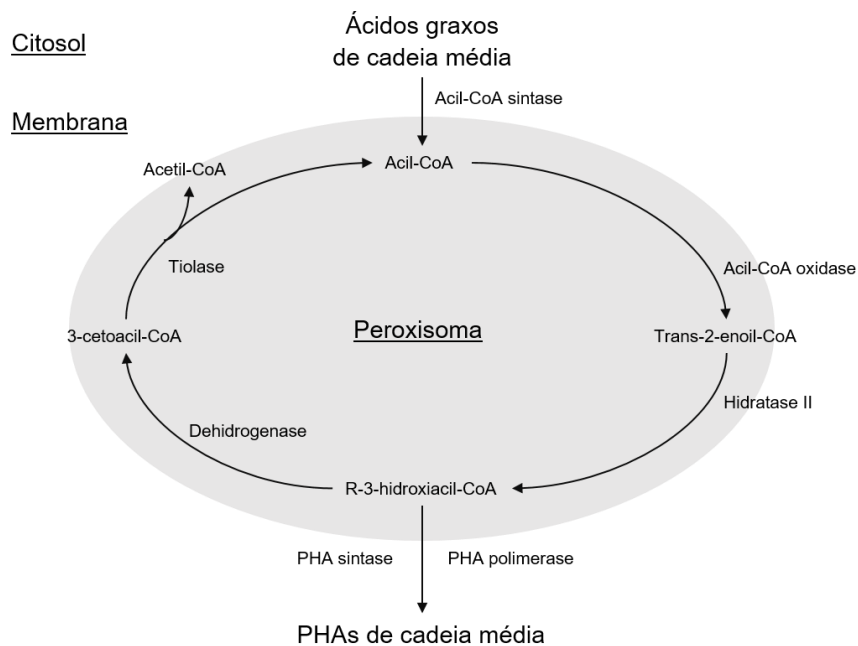


Figura 5- Esquema do metabolismo para produção de PHAs de cadeia média
Fonte: ZHANG; CARLSON; SRIENC (2006).

Conforme as Figuras 4 e 5, a biossíntese dos PHAs ocorre em duas principais etapas: a geração de hidroxiacil-CoAs (HA-CoAs) usando hidroxiácidos graxos de cadeia curta e média, e vários metabólitos como precursores e a polimerização das HA-CoAs em PHAs. As PHA sintases promovem a polimerização das HA-CoAs. Estas enzimas possuem uma grande especificidade de substrato em relação a várias HA-CoAs, dentre as quais a 3-hidroxiacil-CoAs (3HA-CoAs) são os substratos mais favoráveis, embora 4-, 5- e 6-hidroxiacil-CoAs possam ser utilizadas como substratos. A enantioseletividade dos monômeros de PHA é decorrente do fato de que as PHA sintases aceitam apenas (R)-HA-CoAs na cadeia polimérica se um centro assimétrico existir no monômero (PARK *et al.*, 2012; MOZEJKO-CIESIELSKA; KIEWISZ, 2016).

O PHA tem propriedades favoráveis, como tamanho de poro pequeno com alta propensão para ser reciclado, alta proporção de volume para superfície, biodegradabilidade e biocompatibilidade. O PHA tem sido recentemente o ponto de atenção devido às suas várias propriedades vantajosas como fácil processamento, boa resistência aos raios UV, insolubilidade em água, etc. (DWIVEDI *et al.*, 2020).

Quanto maior a massa molecular do biopolímero produzido, melhores serão as suas propriedades. Atualmente o polihidroxibutirato, um scl-PHA, é o

mais conhecido e vem sendo largamente estudado devido às suas propriedades de alto valor agregado (CARDOSO, 2017).

Os PHAs podem ser utilizados em diferentes campos da medicina e das indústrias, como pode-se visualizar na Figura 6.

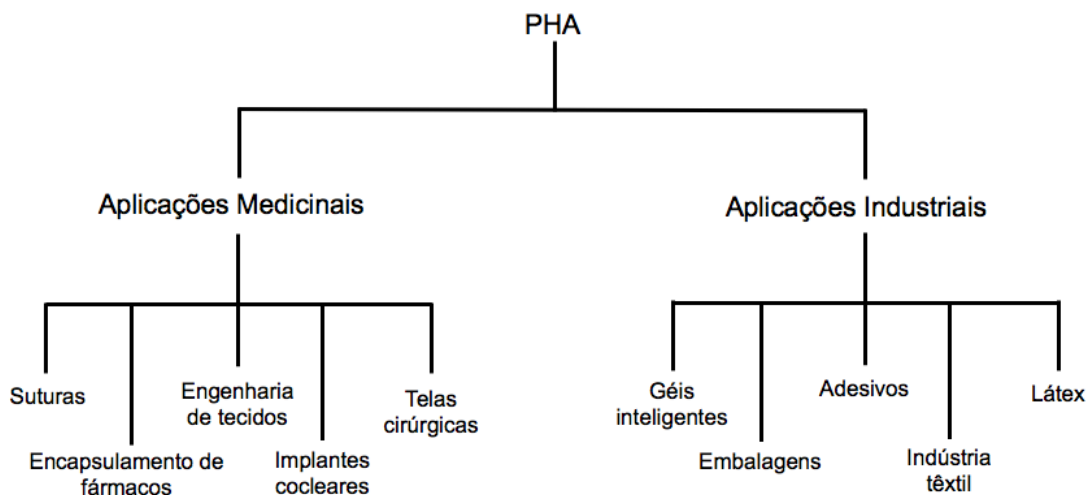


Figura 6- Aplicações de PHA na medicina e nas indústrias.

Fonte: PAKALAPATI, (2018).

Embora o PHA não contribua para o problema do descarte de resíduos devido à sua biodegradabilidade, os altos custos impõem grandes restrições às suas aplicações em larga escala (PU *et al.*, 2020)

Para aumentar a rentabilidade do sistema e facilitar sua implantação no mercado de plásticos, diversas alternativas operacionais foram propostas em escala de laboratório. Uma das alternativas mais promissoras é o uso de subprodutos industriais e/ou fluxos de resíduos, ou seja, matéria-prima agrícola, óleos de plantas residuais ou águas residuais, como fontes de carbono para a produção de PHA (NARODOSLAWSKY; SHAZAD; KOLLMANN., 2015). A produção de PHA usando fluxos de resíduos pode ser considerada um método de gestão ambientalmente correto (ANJUM *et al.*, 2016).

Por várias décadas, os processos de fermentação microbiana foram amplamente desenvolvidos considerando esses fatores para a produção de PHA com custo competitivo. A fonte de carbono não afeta apenas a economia de fabricação do PHA, mas também afeta o crescimento celular, o potencial redox do metabolismo celular, a produtividade, a massa molecular, o rendimento de carbono, a qualidade e a composição do polímero (FAVARO; BASAGLIA; CASSELA, 2019). Assim, a seleção e o custo da fonte de carbono podem ser

considerados como o principal parâmetro de influência e um gargalo dominante para a produção de PHA em escala comercial (SARATALE *et al.*, 2020a, SARATALE *et al.*, 2020b; BHATIA *et al.*, 2018).

Na Tabela 1, a seguir, é possível ter uma visão geral a respeito de algumas estratégias de produção e recuperação de PHAs por via microbiana.

Tabela 1- Visão geral de algumas estratégias de produção e recuperação de PHAs por via microbiana (RAZA; ABID; BANAT, 2018)

Fonte de carbono	Cepa bacteriana	Modo de fermentação	Fator limitante	Peso seco total (g·L ⁻¹)	Taxa de acúmulo de PHA (%)	Rendimento (g·L ⁻¹)
Glicose	<i>Bacillus megaterium</i> uyuni S29	Batelada alimentada	Nitrogênio	28,59	29,7	N/A
Hexadecano	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	Contínuo	Nitrogênio	1,0	7,5	N/A
Decanoato	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3924	Batelada	Nitrogênio	2,2	23,0	N/A
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO 1			2,0	10,0	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3755			3,1	22,0	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 14164			2,8	21,0	
Resíduo de ácido oleico Resíduo de óleo de soja	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 42A2 NCIB 40045	Batelada	Nitrogênio	3,2 N/A	54,6 66,1	N/A
Ácido tereftálico	<i>Pseudomonas putida</i> GO 16	Batelada	Nitrogênio		27,0	0,25
	<i>Pseudomonas putida</i> GO19			1,0	23,0	0,25
	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> GO23				24,0	0,27
Óleo de palma Glicerol comercial Resíduo de glicerol	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3924	Batelada	Nitrogênio	1,8 - 2,7	16,4	0,28 - 1,06
	<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Batelada alimentada	Nitrogênio	N/A	62,0 52,0	51,20 38,10
Acetato	Lodo ativado	Batelada	Nitrogênio Fósforo	N/A	37,0 59,0	N/A
Resíduo de óleo de cozinha Ácidos graxos Glicose	<i>Pseudomonas sp.</i> PS1	Batelada	Nitrogênio	N/A	N/A	2,30
	<i>Pseudomonas sp.</i>	Batelada	Nitrogênio	N/A	49,7- 68,9	2,70
	<i>Pseudomonas putida</i> BET 001	Batelada	Nitrogênio	N/A		10,12 - 15,45
	<i>Bacillus cereus</i>	Batelada	N/A	3,4	49,7	1,19
Glicose	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> GBS1	Batelada	Nitrogênio	N/A	60,0	1,2
	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> GBS2					
	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> GBS3					
	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> GBS4					
	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> GBS6					

3.2.1 Polihidroxibutirato

Os primeiros relatos sobre a descoberta de grânulos lipofílicos brilhantes em células de *Beijeirinckia* ocorreram em 1988, porém, apenas em 1923, utilizando *Bacillus megaterium*, Maurice Lemoigne determinou o primeiro composto chamado de ácido 3-hidroxibutírico [P(3HB)] e identificou esse material como um provável material de reserva. Durante os trinta anos seguintes, o interesse no P(3HB) ficou restrito à descrição de métodos de detecção e determinação do teor do bioplástico nas células e das condições de cultura que levasse a sua síntese e degradação pelo bacilo. Já em 1958, Macre e Wilkinson verificaram que o armazenamento de grânulos através do *B. megaterium* aumentava quando se elevava as proporções de glicose e nitrogênio do meio de cultivo, concluindo que esses compostos são considerados uma fonte de carbono e energia para o microrganismo estudado (CARMIGNAN, 2006).

O polihidroxibutirato (PHB) (Figura 7) foi o primeiro tipo de PHAs descoberto e o mais amplamente estudado. Ele é um dos materiais que pode ser uma alternativa aos polímeros tradicionais, pois apresenta várias semelhanças com os plásticos sintéticos incluindo: cristalinidade, um alto ponto de fusão, pureza óptica e propriedades desejáveis de barreira de água e gás. No entanto, seu custo de produção mais alto está na faixa de US \$ 2,25–2,75 /lb, que é três a quatro vezes mais caro do que os plásticos convencionais (US\$ 0,60–0,87/lb), restringindo seu uso nos setores industrial e comercial. O custo total de produção do PHB depende do microrganismo (rendimento e produtividade), das fontes de carbono e nitrogênio (substratos), das condições de fermentação (temperatura, aeração, valor de pH) e dos processos de recuperação e purificação. A fonte de carbono pode representar 25 a 45% dos custos totais de produção (ASHTER, 2016; NATH *et al.*, 2008; SINGH *et al.*, 2019; YEO *et al.*, 2018) daí a necessidade de encontrar fontes de carbono mais baratas.

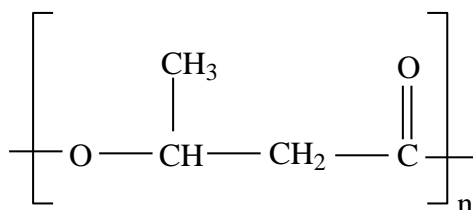


Figura 7- Estrutura química do polihidroxibutirato

De acordo com a literatura, o PHB é considerado um polímero promissor, pois pode ser produzido a partir de fontes renováveis e sustentáveis como bactérias e plantas com a vantagem de ser degradado por diversos microrganismos aeróbios e anaeróbios. No entanto, também é importante mencionar que alguns autores identificaram algumas desvantagens para o PHB, como alta cristalinidade, fragilidade e baixa extensão para quebrar (DOMÍNGUEZ-DÍAZ *et al.*, 2015; RODRÍGUEZ-PÉREZ *et al.*, 2018).

É um plástico biodegradável que não libera resíduos nocivos no meio ambiente como os plásticos convencionais.

Os resíduos agroindustriais são vistos como grandes candidatos na produção deste tipo de biopolímero, uma vez que apresentam características desejadas, além do baixo custo e alta disponibilidade. O fato destes resíduos serem utilizados como substratos na produção de PHB, o que antes era resíduo para as indústrias e necessitava de uma destinação direta, agora, esta etapa é evitada e contribui na solução de um problema ambiental.

O polihidroxibutirato pode ser produzido através da fermentação microbiana de açúcares redutores (principalmente hexose). O PHB na forma de grânulos intracelulares (Figura 8) é sintetizado por várias espécies microbianas como energia, materiais de reserva sob estresses ambientais, como concentrações limitadas de nitrogênio, oxigênio e nutrientes de fosfato, mas uma fonte de carbono em excesso (STEINBUCHEL, 1991; LEE, 1996). O PHB é o membro de PHAs mais amplamente estudado e melhor caracterizado, que acumulou até 80% do peso seco da célula (KESHAVARZ; ROY, 2010; YU; STAHL, 2008).

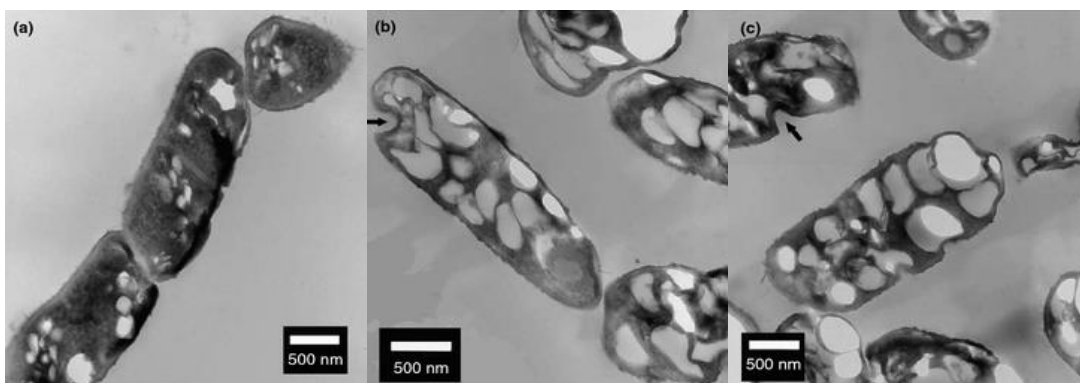


Figura 8- Grânulos de P(3HB) em *B. megaterium* após 4 h (a), 12 h (b) e 21 h (c) obtidos através de microscopia eletrônica de transmissão (TEM). As setas indicam fraturas na parede celular devido ao tamanho dos grânulos de P(3HB). Fonte: RODRÍGUEZ-CONTRERAS *et al.* (2013)

O P(3HB) sólido é um material semicristalino, cujo grau de cristalinidade varia entre 60 a 90%. Essa característica é responsável por todas as propriedades mecânicas e físicas do polímero, como por exemplo, ser muito rígido e quebradiço. Quando a sua massa molar está na faixa de 10.000 a 3.000.000 g mol⁻¹ quando produzido por bactérias (ALBUQUERQUE, 2019).

A Tabela 2 apresenta características físico-químicas do PHB em comparação às do polipropileno (PP). É possível observar que a maior parte das características dos polímeros são semelhantes, como por exemplo a temperatura de fusão, cristalinidade, densidade e módulo de Young, sendo este último um parâmetro para medir a rigidez de materiais sólidos, podendo variar de 0,002 a 4,8 GPa. As principais diferenças entre o PHB e o PP são referentes às suas propriedades elastoméricas, como a força de tensão e resistência a ruptura, as quais são melhores no polipropileno, o que ressalva o potencial termoplástico do polihidroxibutirato.

Tabela 2- Características físico-químicas do polihidroxibutirato (PHB) e do polipropileno (PP)

Características	PHB	PP
Temperatura de fusão (°C)	175	176
Temperatura de transição vítrea (°C)	4	-10
Cristalinidade (%)	60	50
Densidade (g.cm ⁻³)	1.25	0.91
Módulo de Young (GPa)	3.5	1.5
Força de tensão (Mpa)	0	38
Resistência à ruptura (%)	5	400

Fonte: Adaptado de Chodak (2008)

3.3 *Bacillus megaterium*

Existem vários fatores, como seleção de microrganismos, meio de crescimento, fontes de nitrogênio, relação carbono-nitrogênio, temperatura, pH e demanda de oxigênio dissolvido, para obter um maior rendimento de polímero e produtividade volumétrica (RAZA *et al.*, 2019).

Dentre os microrganismos produtores de PHA, existem também os *Bacillus*, encontrados comumente no ambiente, porém, diante da variedade de espécies existentes, ainda são pouco explorados (LAW *et al.*, 2003). Apesar

desse fato, o uso de espécies de *Bacillus* tem muitas vantagens sobre outras espécies bacterianas para a produção de PHAs devido à ausência de camada de lipopolissacarídeo facilitando a extração, sua capacidade de crescer em matérias-primas baratas e alta taxa de crescimento em comparação com outras bactérias (KHIYAMI; FADUAL; BAHKLIA, 2011).

O *B. megaterium* é uma bactéria aeróbia, gram-positiva e neutra em forma de bastonete, formadora de esporos, encontrada em diversos habitats, mas comumente considerada uma bactéria do solo; o comprimento da célula do *Bacillus megaterium* fica em torno de 1,5 a 4 µm de diâmetro. Sua capacidade de utilizar diferentes fontes de carbono e crescer em uma ampla faixa de temperatura (3 a 45°C) o torna um organismo industrial ideal (WHITMAN *et al.*, 2009; VARY *et al.*, 2007; MARULANDA-AGUIRRE *et al.*, 2008).

É amplamente utilizado na produção de ácido poli-hidroxitubúrico, utilizando como fonte de carbono de resíduos agroindustriais, considerados substratos de baixo valor agregado (SATHIYANARAYANAN *et al.*, 2013; GOUDA; SWELLAM; OMAR, 2001), sem necessidade de modificação genética.

3.4 Uso de coprodutos da indústria de alimentos para a síntese de PHAs

Em vários processos das agroindústrias, existe a formação de resíduos que possuem considerável valor agregado, na sua forma natural ou não. Os resíduos gerados também chamados de subprodutos, representam perdas econômicas no processo produtivo e, em alguns casos, não recebem destinação adequada, causando problemas ambientais, demonstrando uma necessidade de alternativas para aproveitá-los (PELIZER; PONTIERI; MORAES, 2007).

O desenvolvimento de novas formas de utilizar coprodutos e/ou coprodutos oriundos da cadeia produtiva da indústria de alimentos auxilia no aumento do equilíbrio entre produção de meio ambiente (NDUBUISI-EZEJIOFOR; ENEBAKU; OGUEKE, 2014; ARAÚJO *et al.*, 2015).

Dentre os inúmeros coprodutos que podem ser utilizados como fonte de substrato para a síntese de PHAs, pode-se mencionar a água de parboilização do arroz. O processo de parboilização é amplamente utilizado no Brasil, sendo que a parboilização consiste na imersão do grão de arroz em água em uma temperatura superior a 58°C. Isso faz com que o amido presente no grão seja

gelatinizado e subsequentemente retrogradado. A parboilização é realizada em três etapas principais: a) Maceração; o arroz com casca é colocado em tanques com água aquecida por algumas horas. Neste processo, as vitaminas e sais minerais que se encontram na película e germe penetram no grão; b) Gelatinização: o arroz úmido é submetido a um aumento na temperatura e pressão causando alterações na estrutura do amido. Isto faz também com que o grão seja compactado; c) Secagem: Os grãos são secos para posterior descascamento, polimento e seleção (ABIAP, 2013).

A água gerada neste processo (APA) é rica em fósforo e nitrogênio, apresentando uma proporção de N/F de 2 a 5. A APA apresenta ainda uma coloração que varia entre o amarelo claro e castanho, baixa viscosidade e pH ácido.

Outra indústria que gera coprodutos que poderiam ser empregados na biotecnologia é a de balas e confeitos. O setor apresenta grande diversidade de produtos e processos, sendo que 25 empresas atuam no Brasil (ABICAB, 2018). Segundo Miah *et al.* (2018), a indústria possui 3 setores principais, produtos à base de açúcar (caramelos, balas, gomas de mascar), produtos à base de chocolate e produtos de confeitaria (bolos, biscoitos recobertos com chocolate, etc.).

Os principais coprodutos da indústria vêm na forma de efluentes, ricos em açúcares e/ou gorduras, o que faz com que eles possam causar impactos graves ao meio ambiente caso sejam descartados sem tratamento adequado. Entretanto, a alta demanda química e bioquímica de O₂ em conjunto com o grande volume de efluente gerado torna o tratamento adequado dos efluentes um processo custoso (MAQBOOL *et al.*, 2017; PAPADAKI *et al.*, 2018).

Até o momento ainda existem poucos estudos sobre a utilização destes coprodutos na produção de PHAs (HASSEMER *et al.*, 2021), porém ambos apresentam potencial de aplicação como substrato para o cultivo de microrganismos e de biocompostos (ARAÚJO *et al.*, 2015; MUKHERJEE *et al.*, 2016).

3.5 Sistemas de bioprodução de P(3HB)

Grande parte dos processos biotecnológicos têm sido conduzidos em frascos agitados, porém, quando há interesse de aplicação em larga escala, é conveniente realizar ensaios em biorreatores, considerando que eles representam adequadamente a realidade industrial (MANOWATTANA *et al.*, 2018). Sendo assim, diversos sistemas podem ser empregados, como: descontínuo (batelada), semicontínuo, descontínuo alimentado (batelada alimentada) ou contínuo. Estes processos são os mais seguros em relação a contaminação, porém podem apresentar baixos rendimentos devido a possíveis inibições por substrato ou produção de compostos secundários (SCHMIDELL, *et al.*, 2001; LUNA-FLORES *et al.*, 2010).

Em um sistema descontínuo, o mosto esterilizado no fermentador é inoculado com o microrganismo de interesse estudado e incubado de modo que o processo ocorra sob condições controladas. O reator permanece lacrado durante todo o processo e nada além de oxigênio (no caso de processos aeróbicos), ácido ou base (controle de pH) e antiespumante são adicionados. Por fim, descarrega-se a dorna e o meio fermentado é conduzido para os tratamentos finais (GAYESKI *et al.*, 2021).

Os sistemas em biorreator batelada simples apresentam baixos riscos de contaminação, elevada flexibilidade de operação, permitem a realização de fases sucessivas no mesmo recipiente, assim como, um controle rigoroso das condições para garantir a estabilidade genética do microrganismo (SCHMIDELLI *et al.*, 2001; MATA-GÓMEZ *et al.*, 2014).

O emprego de cultivos em batelada alimentada é impulsionado pela busca de alta densidade celular e/ou máxima formação de produto.

A característica básica dos processos microbianos em batelada alimentada é que as concentrações de nutrientes alimentados no biorreator podem ser controladas por mudanças na velocidade de alimentação (URNAU *et al.*, 2020). Para isso, faz-se necessário definir o tipo de nutriente a ser disponibilizado e o modo de alimentação (MEARS *et al.*, 2017).

Uma boa estratégia para condução da fermentação em batelada alimentada com diversos tipos de microrganismos é a alimentação de substrato

limitante na mesma velocidade que este é utilizado pelo microrganismo (MEARS *et al.*, 2017).

3.6 Recuperação de biopolímeros

A recuperação é uma das etapas importantes na cadeia produtiva do P(3HB) e demais PHAs. A escolha do método de recuperação do polímero do meio intracelular é determinante para o custo final do produto. Por isso, a fim de aumentar o rendimento dessa etapa, pode ser associada uma técnica de pré-tratamento da biomassa, que têm como principal finalidade fragilizar a parede celular e facilitar a separação da parcela polimérica da não-polimérica. As principais técnicas de recuperação são: método de digestão celular, separação mecânica, extração por solventes, tratamento enzimático, tecnologia supercrítica e de ultrassom (BORGES, 2017; KUNASUANDRI; SUDESH, 2011; KOSSEVA; RUSBANDI, 2018; KESSLER *et al.*, 2001; KOSSEVA, RUSBANDI, 2018; KAPRITCHKOFF *et al.*, 2006; HASSEMER, 2021; KOSSEVA; RUSBANDI, 2018).

A extração por solvente foi um dos primeiros métodos a ser utilizado para recuperar os PHAs de dentro das células bacterianas. O princípio dessa técnica é de que o solvente é capaz de modificar a permeabilidade da parede celular, fazendo com que o biopolímero seja liberado da célula. Para realizar sua recuperação, utiliza-se um solvente no qual o biopolímero precipite e então se pode realizar a separação por centrifugação ou filtração. As principais vantagens da utilização desse método são o alto teor de pureza do biopolímero extraído, uma vez que o solvente não cause sua degradação. Além disso, a utilização de solventes proporciona também a remoção de endotoxinas, permitindo sua utilização em aplicações médicas. Por outro lado, prejudica a morfologia natural dos grânulos, que podem ser úteis na produção de fibras (JACQUEL *et al.*, 2008).

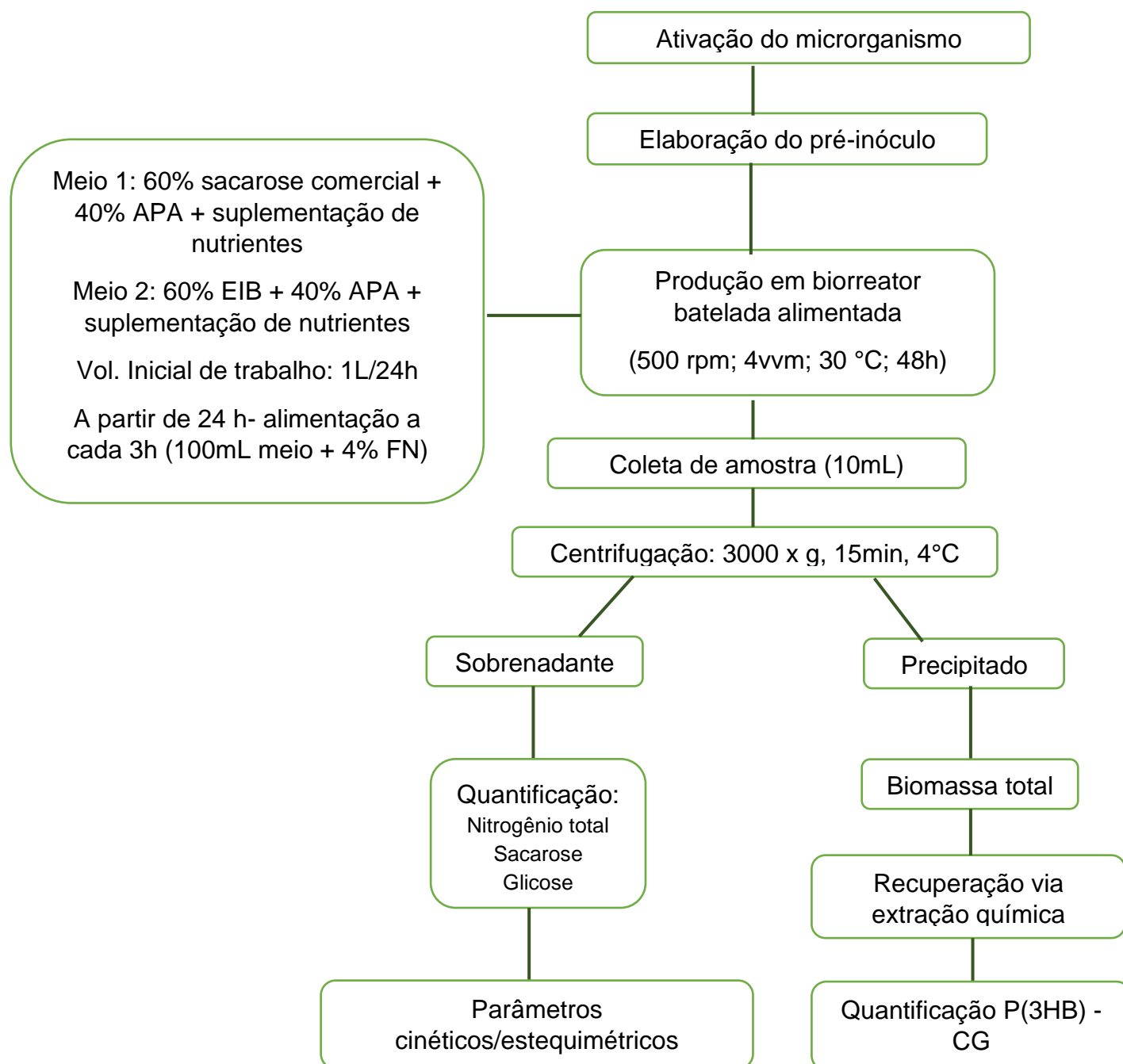
Dentre os solventes utilizados, os mais comuns são clorofórmio, diclorometano e éter de petróleo, porém compostos como metanol e propanol podem ser aplicados com rendimento reduzido (KUNASUNDARI; SUDESH, 2011; KOSSEVA; RUSBANDI, 2018).

As principais desvantagens deste método são o impacto ambiental e a possível toxicidade do polímero devido a presença de resíduos de solvente. Isto faz ainda com que a utilização do PHA extraído com solvente se torne inviável nas indústrias de alimentos e na área biomédica devido ao potencial de migração de traços de solvente para o organismo ou alimento (KOSSEVA; RUSBANDI, 2018).

4 Materiais e métodos

Neste capítulo serão descritos os materiais e metodologias empregadas nos experimentos de produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* ATCC 14581 em biorreator batelada alimentada, utilizando meio com sacarose comercial e coprodutos agroindustriais como substratos, bem como a recuperação de polímero via extração química. A Figura 9 apresenta um fluxograma esquemático das etapas realizadas no estudo.

Figura 9- Fluxograma do processo de bioprodução de P(3HB).



4.1 Microrganismo

A bactéria *Bacillus megaterium* ATCC 14581 adquirida da Fundação André Tozello foi utilizada durante os ensaios, sendo que mesma mantida em ultra freezer (MDF-U3086S, Sanyo Electric Co., Japão), a $-80^{\circ}\text{C} \pm 2$, em solução crioprotetora (20 % glicerol) até o momento de sua utilização.

4.2 Caracterização dos Coprodutos

Baseado em experimentos preliminares realizados por Hassemer (2016), realizou-se os cultivos do microrganismo, empregando dois coprodutos da indústria de alimentos: água de parboilização de arroz (APA) cedida pela Indústria Nelson Wendt (Pelotas, Rio Grande do Sul) e efluente da lavagem de drageadeiras da indústria de balas (EIB) cedido por uma empresa de balas e chocolates da região norte do estado do Rio Grande do Sul. A composição do meio utilizado também foi baseada em Hassemer (2016), sendo que a proporção utilizada para a constituição do mesmo na produção de polihidroxibutirato, foi de 60% de EIB e 40% de APA. Além disso, este meio foi enriquecido com uma solução de micronutrientes cujas concentrações podem ser visualizadas nas Tabelas 3 e 4, e sulfato de amônio (4%) como fonte de nitrogênio.

Tabela 3- Composição do meio mineral

Composto	Concentração (g·L ⁻¹)
Na ₂ HPO ₄	3,6
KH ₂ PO ₄	1,5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,05
Ácido Cítrico	0,1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,01
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,008
Sol.micronutrientes	1*

*Unidade de medida: mL· L⁻¹

Tabela 4- Composição da solução de micronutrientes

Composto	Concentração (mg·L ⁻¹)
H ₃ BO ₃	300
CoCl ₂ ·6H ₂ O	200
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	30
MnCl ₂ ·4H ₂ O	30
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	30
NiSO ₄ ·7H ₂ O	30
CuSO ₄ ·5H ₂ O	10

Antes de iniciar o preparo dos cultivos realizou-se a determinação dos °Brix do EIB, sendo que devido à baixa concentração de sacarose foi necessário concentrar $\pm 18^\circ\text{Brix}$ (Hassemer *et al.*, 2021).

A APA foi submetida a pré-tratamento para a remoção dos sólidos em suspensão.

4.3 Bioprodução de P(3HB)

4.3.1 Ativação do microrganismo

A cepa de *B. megaterium* foi adquirida sob a forma de “pellet” liofilizado, sendo necessário realizar um processo de reativação. O cultivo utilizou meio mineral suplementado de glicose ($32 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e fonte de nitrogênio (sulfato de amônio, $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),

O processo de ativação foi realizado adaptando os parâmetros empregados por Faccin (2012) e Hassemer *et al.* (2021). A ativação ocorreu em agitador mecânico (shaker) utilizando frascos com volume de 250 mL, contendo 50 mL de meio, 30°C , 180 rpm por um período de 16 h. Para conservação da cultura, 1 mL do inóculo foi adicionado em 100 μL de glicerol em frascos(*eppendorf*) e -80°C .

4.3.2 Pré-inóculo e meios meios de cultura

A elaboração do pré-inóculo consistiu na adição de 2 mL de solução crioprotetora (*B. megaterium*) no meio mineral contendo sacarose e sulfato de amônio ($16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente), com pH inicial ainda sendo ajustado para 7,0 com solução de HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M (FACCIN, 2012).

O cultivo foi mantido a 30°C , 180 rpm por 16 h. Após o período de incubação, o mesmo foi padronizado para uma densidade ótica de 1,0 em espectrofotômetro (Cary-8553, Agilent, Estados Unidos) a 625 nm (HASSEMER, 2016). Após padronização do pré-inóculo adicionou-se 1 mL do mesmo aos ensaios de produção de P(3HB).

4.4 Produção de P(3HB) em biorreator batelada alimentada

Para a bioprodução em batelada alimentada, seguiu-se a metodologia previamente definida por Hassemer (2021), com modificações, em ensaios de maximização da bioprodução de P(3HB) em biorreator, onde utilizou-se uma temperatura de 30°C por meio da circulação de água pelas paredes externas do fermentador, aeração de 4 vvm, agitação mecânica de 500 rpm e cultivo modificado para 48 h.

Os ensaios foram conduzidos em biorreator (Biostat B, B. Braun Biotech International Co., Alemanha) com volume total correspondente a 2 L e volume máximo de trabalho de 1,8 L. O frasco foi acoplado a uma unidade de controle que permitiu o monitoramento da velocidade de agitação e temperatura do meio de cultura. A aeração do sistema foi realizada utilizando ar ambiente bombeado via compressor (Inalar Compact, NS, Brasil).

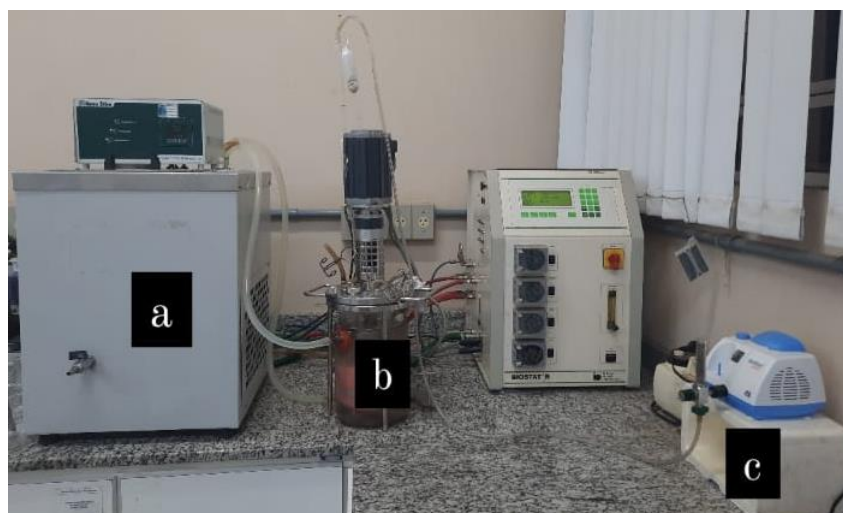


Figura 10- Aspecto geral da Unidade de bioprodução de P(3HB) em Biorreator: a – Banho termostático; b – Frasco de vidro e sistema de controle; c- Controlador de aeração.

A bioprodução de P(3HB) pelo sistema alimentado seguiu as metodologias proposta por Colet *et al.* (2017), Pavan *et al.* (2019) e Hassemer (2016) com adaptações. O sistema foi iniciado com volume de 1 L de meio (Meio 1 - 60% de sacarose comercial e 40% de APA; Meio 2 - 60% de EIB e 40% de APA). O inóculo com o *B. megaterium*, após estar padronizado, foi adicionado no tempo 0 h juntamente com fonte de nitrogênio, sendo 2% e 4%, respectivamente. Amostras (10 mL) foram coletadas a cada 3 h ($t_i=0$ h), antes e após o procedimento de alimentação, sendo que a primeira alimentação ocorreu

em 24 h de cultivo, adicionando-se 100 mL de meio de cultura estéril e 4% de FN, obtendo-se um volume final de 1,8 L.

A utilização dos dois tipos de meio variando a fonte de carbono teve como objetivo fins de comparação.

4.5 Parâmetros cinéticos e estequiométricos da produção de P(3HB)

Com o objetivo de obter parâmetros cinéticos e estequiométricos do consumo de substratos (nitrogênio, sacarose e glicose), produção celular e de P(3HB), realizaram-se coletas (10 mL) de amostras a cada 3 h, antes e após o procedimento de alimentação, sendo que a primeira alimentação ocorreu em 24 h de cultivo.

4.5.1 Velocidades instantâneas e específicas globais

A partir dos perfis de concentração celular global, formação de produto global e consumo de substrato global (nitrogênio total – NT, sacarose e glicose) em relação ao tempo, foi possível determinar, através de balanço de massa para cada componente, as velocidades de crescimento microbiano (r_x), formação de produto (r_p) e consumo de substrato ($r_{si} = r_{sn}$, r_{ss} e r_{sg}) descritas nas Equações 1, 2 e 3, conforme Baylei *et al.*(1986).

$$r_x = \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

$$r_p = \frac{dP}{dt} \quad (2)$$

$$r_{si} = \frac{dSi}{dt} \quad (3)$$

Dividindo-se as velocidades instantâneas pela concentração celular naquele instante, as velocidades específicas de crescimento (μ_x), formação de produto (μ_p) e consumo de substrato ($\mu_{si} = \mu_{sn}$, μ_{ss} e μ_{sg}) foram obtidas (Equações 4, 5 e 6), conforme Bailey *et al.* (1986).

$$\mu_x = \frac{r_x}{X} \quad (4)$$

$$\mu_p = \frac{r_p}{X} \quad (5)$$

$$\mu_{Si} = \frac{r_{Si}}{X} \quad (6)$$

A determinação das velocidades constantes (fase exponencial), foi realizada através do coeficiente angular da melhor reta ajustada nas curvas que representam as cinéticas de crescimento e produção de P(3HB).

4.5.2 Fatores de conversão global

4.5.2.1 Produto

O fator de conversão de nitrogênio global em P(3HB), $Y_{P/Sn}$ (g P(3HB)·g NT⁻¹) foi expresso pela Equação 7.

$$Y_{P/Sn} = \frac{r_p}{r_{Sn}} = -\frac{dP}{dSn} \quad (7)$$

O fator de conversão de sacarose global em P(3HB), $Y_{P/Ss}$ (g P(3HB)·g sacarose⁻¹), foi expresso pela Equação 8.

$$Y_{P/Ss} = \frac{r_p}{r_{Ss}} = -\frac{dP}{dSs} \quad (8)$$

O fator de conversão de glicose global em P(3HB), $Y_{P/Sg}$ (g P(3HB)·g glicose⁻¹), foi expresso pela Equação 9.

$$Y_{P/Sg} = \frac{r_p}{r_{Sg}} = -\frac{dP}{dSg} \quad (9)$$

4.6.2.2 Fatores de conversão celular

O fator de conversão de nitrogênio global em células, $Y_{X/Sn}$ (g células·g NT⁻¹), foi expresso pela Equação 10.

$$Y_{X/Sn} = \frac{r_x}{r_{Sn}} = -\frac{dX}{dSn} \quad (10)$$

O fator de conversão de sacarose global em células, $Y_{X/Ss}$ (g células·g sacarose⁻¹), foi expresso pela Equação 11.

$$Y_{X/Ss} = \frac{r_x}{r_{Ss}} = -\frac{dX}{dSs} \quad (11)$$

O fator de conversão de glicose global em células, $Y_{X/Sg}$ (g células·g glicose⁻¹), foi expresso pela Equação 12.

$$Y_{X/Sg} = \frac{r_x}{r_{Sg}} = -\frac{dX}{dSg} \quad (12)$$

A relação entre a produção de P(3HB) e a produção de células global, $Y_{P/X}$ (g P(3HB)·g células⁻¹), foi expressa pela Equação 13.

$$Y_{P/X} = \frac{r_p}{r_x} = -\frac{dP}{dX} \quad (13)$$

Onde:

r_x = velocidade de crescimento das células (g·L·h⁻¹);

r_{Sn} = velocidade de consumo de nitrogênio (g·L·h⁻¹);

r_{Ss} = velocidade de consumo de sacarose (g·L·h⁻¹);

r_{Sg} = velocidade de consumo de glicose (g·L·h⁻¹);

r_p = velocidade de produção de P(3HB) (g·L·h⁻¹).

4.5.3 Produtividade global

A produtividade global tanto para células como para P(3HB) é definida, como as velocidades r_x e r_p , segundo Bailey *et al.* (1986).

4.6 Metodologia Analítica

Ao longo do estudo, diversas metodologias foram empregadas para quantificação de diferentes compostos presentes nos meios de cultura, bem como, a presença de P(3HB). As características dos métodos utilizados encontram-se descritos na sequência.

4.6.1 Nitrogênio total

A concentração de nitrogênio total (NT) do sobrenadante foi determinada através do método de Kjeldahl (IAL, 2008), que consiste em três etapas: digestão, destilação e titulação. Inicialmente, as amostras líquidas foram concentradas em banho-maria até a evaporação da água. Posteriormente, a amostra foi digerida com ácido sulfúrico concentrado e catalisador (Se/CuSO₄) sob aquecimento contínuo, convertendo o nitrogênio orgânico em Sulfato de amônio. Na etapa posterior, a solução obtida foi alcalinizada com hidróxido de sódio 40%, e com isso a amônia produzida nessa etapa foi destilada e captada por uma solução de ácido bórico 4% (indicador misto) e titulada com ácido clorídrico 0,1 N.

4.6.2 Açúcares redutores e não-redutores

A determinação de açúcares (redutores: glicose; não-redutores: sacarose) foi realizada através da medida da liberação de grupos redutores pelo método DNS (ácido dinitrosalisílico), proposto inicialmente por Miller (1959), com modificações.

O primeiro passo para a realização da análise, foi a construção das curvas de calibração para sacarose e glicose: Para curva da sacarose hidrolisada, Figura 18 (Apêndice I), preparou-se uma solução de sacarose 30 g L^{-1} (solução A). Adicionou-se 10 mL de solução A com 10 mL de HCl 2 N (solução B). Essa mistura foi levada para ebulição por 10 min. Após, deixou-se resfriar em banho de gelo. Ao atingirem a temperatura ambiente, adicionou-se 10 mL de NaOH 2 N. A curva padrão foi de 0,1 a $1,0 \text{ g L}^{-1}$. A equação da reta pode ser visualizada no Apêndice I.

Soluções padrão de 0,1 a 1 g/L , foram preparadas para a curva da glicose, Figura 19 (Apêndice I). Em cada tubo das diferentes concentrações, adicionou-se 1 mL de DNS e estes foram homogeneizados. Em seguida os tubos foram deixados em banho termostatizado (521/30 Nova Ética, Brasil) (água em ebulição) por 8 min. Decorrido este tempo, deixou-os em banho de gelo e adicionou-se 8 mL de solução de tartarato de sódio potássio e realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Logen Scientific, LS-7052-BIV) a 540 nm. A equação da reta pode ser visualizada no Apêndice I.

Para determinação dos açúcares redutores e não-redutores utilizou-se 1 mL de sobrenadante das amostras, adicionou-se 1 mL de DNS e estes foram homogeneizados. Em seguida os tubos foram deixados em banho termostatizado (521/30 Nova Ética, Brasil) (água em ebulição) por 8 min. Decorrido este tempo, deixou-os em banho de gelo e adicionou-se 8 mL de solução de tartarato de sódio potássio e realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Logen Scientific, LS-7052-BIV) a 540 nm.

4.6.3 Densidade

O perfil de densidade dos coprodutos foi realizado utilizando um densímetro (Baumé, Labsynth, Brasil) com escala 0/20. Os testes foram

realizados sob temperatura de 25 °C com água destilada como controle (IAL, 2008)

4.6.4 Carbono orgânico e nitrogênio total

A concentração de carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT) presente nos efluentes foram realizadas utilizando um analisador de carbono (TOC-V CSH, Shimadzu, Japão) acoplado a um injetor automático e utilizando ar sintético como gás de arraste. A interface de coleta de dados utilizada foi o sistema TOC Control-V.

A concentração de COT foi medida pelo método indireto, ou seja, utilizando as reações de oxidação do carbono orgânico e inorgânico presentes na amostra para determinar o carbono orgânico total.

4.6.5 Biomassa total

A determinação de biomassa total foi realizada de acordo com metodologia descrita por Hassemer *et al.* (2021). Inicialmente, as amostras foram centrifugadas (MPW 351R, Rotor 11457, MPW Medical Instruments, Polônia) a 3000 x g, 15 min, 4°C, sendo que o sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com água destilada entre as centrifugações. A biomassa precipitada foi dessecada em estufa (NV-1.3, Nevo, Brasil) a 50°C, até massa constante.

4.6.6 Recuperação de P(3HB) via extração química

A quantidade de polímero produzida ao longo dos cultivos foi extraída e quantificada de acordo com metodologia descrita Hassemer *et al.* (2021).

Para realizar a extração empregou-se 0,01 a 0,04 g de biomassa seca, adicionou-se 2 mL de 1,2-dicloroetano, 2 mL de n-propanol acidificado (20 % HCl) e 200 µL de controle interno (50 mL de n-propanol com 2 g de ácido benzoico). Posteriormente, as amostras foram aquecidas em banho termostatizado (521/30 Nova Ética, Brasil) a 80°C por 3 h com agitação a cada 20 min, resfriadas a 22°C, adicionou-se 4 mL de água destilada e submeteu-se a agitação em Vortex (Kasvi, K40-10208) para separação das fases (Figura 11).

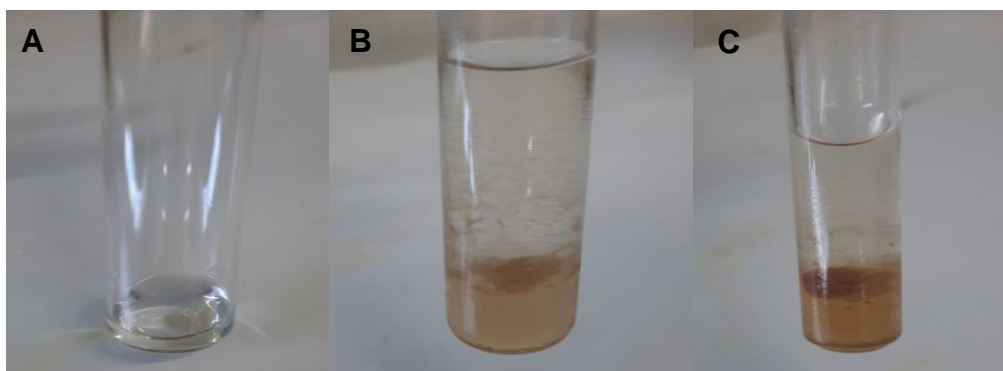


Figura 11- Separação de fases de diferentes amostras. Controle negativo (A), amostras com células (B e C).

4.6.7 Quantificação de P(3HB)

A quantificação de P(3HB) foi realizada seguindo metodologia descrita por Hassemer (2016), utilizando cromatógrafo gasoso (CG-2010, Shimadzu, Japão) equipado de amostrador e injetor automático (AOC-20i e AOC-20s, respectivamente) e detector de ionização de chama (FID). Utilizou-se nitrogênio (N_2) como gás de arraste com vazão de 2 mL L^{-1} . A coluna utilizada foi a Rtx-Wax (30 cm x 0,25 mm x 0,10 μm) com temperatura inicial de 120°C e aumento de 10°C por minuto até 190°C. As temperaturas do injetor e do detector permaneceram em 250°C ao longo da corrida.

Para cada experimento utilizou-se uma curva de calibração (0,005 a 0,045 g) com P(3HB) padrão (Sigma-Aldrich), com o objetivo de diminuir a margem de erro levando em conta as possíveis variações na temperatura do processo.

4.7 Análise estatística dos resultados

Os resultados ($n = 3$) da composição dos coprodutos agroindustriais foram tratados estatisticamente pela análise de variância - ANOVA, comparação de médias pelo teste *t-student* com auxílio do software STATISTICA versão 5.0 (StatSoft/Dell, USA), com 95% de confiança.

5 Resultados e discussões

Neste item serão apresentados os resultados e discussões da caracterização dos coprodutos agroindústrias e da bioprodução de P(3HB) em biorreator batelada alimentada, bem como, da recuperação do polímero.

5.1 Caracterização dos coprodutos agroindustriais

A Tabela 5 apresenta o nitrogênio total (NT), carbono orgânico total (COT) e a densidade dos coprodutos da agroindústria (água de parboilização de arroz - APA e efluente da indústria de balas - EIB).

Tabela 5- Concentração de nitrogênio total (NT), carbono orgânico total (COT) e densidade dos coprodutos agroindustriais

Coprodutos	NT (mg·L ⁻¹)	COT (g·L ⁻¹)	Densidade (g·cm ⁻³)
APA	160,00 ^a ± 25,00	0,434 ^b ± 0,195	1,002 ^b ± 0,012
EIB	2,00 ^b ± 0,20	171,75 ^a ± 0,650	1,210 ^a ± 0,010

*Média ± desvio padrão seguida de letras iguais/colunas indicam não haver diferença significativa a nível de 95% de confiança (Teste *t-student*).

O EIB apresenta densidade superior ($p < 0,05$) a APA, fato associado principalmente a elevada composição de carbono orgânico total. No entanto, possui baixo teor de nitrogênio total. Fato considerado previsível, uma vez que este efluente é oriundo da lavagem das drageadeiras utilizados na produção de balas e confeitos.

Em contrapartida a APA apresenta teores baixos de carbono orgânico, diferindo significativamente ($p < 0,05$) da EIB e um teor de nitrogênio total de 160 mg L⁻¹.

Hassemer (2021) ao caracterizar a EIB e a APA obteve baixos teores de componentes minerais, com teor de 4,8 e 36,5 mg L⁻¹ para cálcio, 5,5 e 75,5 mg L⁻¹ para sódio e 0,8 e 36,5 mg L⁻¹ para magnésio, respectivamente.

Isto indica que a utilização do EIB e APA, como únicos componentes do meio de cultura, acarretará em deficiência de componentes minerais necessários para a manutenção do metabolismo celular (MUTIARA *et al.*, 2014;

GRUMEZESCU; HOLBAN, 2018). A caracterização de carbono orgânico e nitrogênio, bem como os demais componentes minerais é importante, para definir a composição de fonte de carbono e minerais no meio de cultivo e desta forma verificar a necessidade ou não de suplementação com meio mineral.

5.2 Cinética da produção de P(3HB) em biorreator batelada alimentada

5.2.1 Cultivo com fonte de carbono sintética

A Figura 12 apresenta a cinética de produção de P(3HB) (g L^{-1} e %) e de biomassa em meio de cultivo composto por sacarose comercial (60%) e APA (40%).

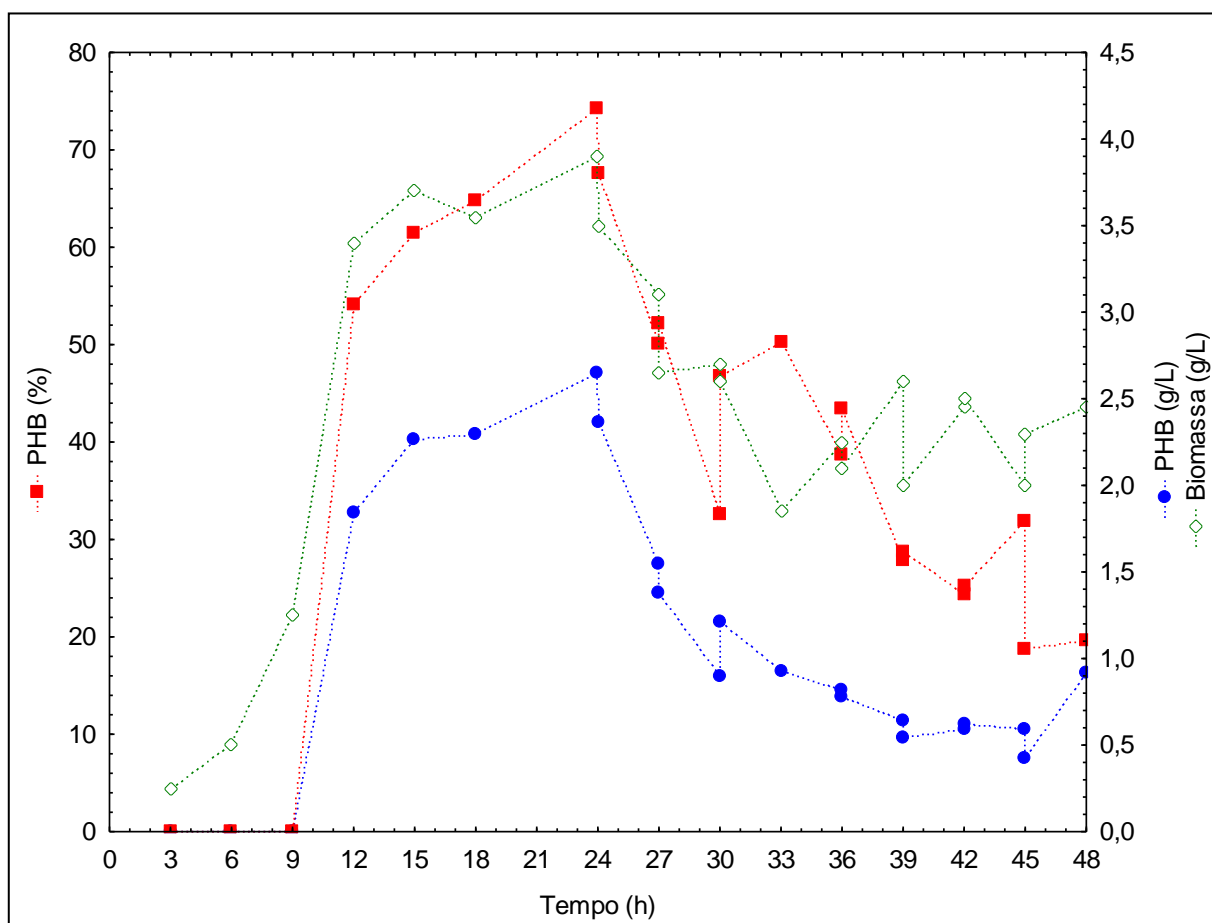


Figura 12- Cinética de bioprodução de P(3HB) e biomassa (g L^{-1} e %) em meio de cultivo composto por sacarose comercial (60 %) e APA (40 %).

A concentração máxima de biomassa foi de $3,90 \text{ g L}^{-1}$ e de P(3HB) de $2,87 \text{ g L}^{-1}$ (74,2%) em 24 h de cultivo. Após este período ocorreu oscilações nas concentrações de P(3HB) e de biomassa, possivelmente ao consumo de produto

pelo microrganismo, seja pela falta de substratos viáveis e/ou presença de compostos tóxicos ou alterações na temperatura e oxigenação do meio (HASSEMER *et al.*, 2021; HONG; LIN; LIN, 2008; SUAREZ *et al.*, 2012; KOSSEVA; RUSBANDI, 2018; THOMAS; BALAKRISHNAN; SREEKALA, 2018).

5.2.2 Cultivo com coprodutos agroindustriais

A partir do resultado obtido utilizando o meio com sacarose comercial, realizou-se o cultivo substituindo esta fonte de carbono, pelo efluente da indústria de balas (EIB). A Figura 13 apresenta a cinética de produção de P(3HB) (g L^{-1} e %) e de biomassa em meio de cultivo composto por EIB (60%) e APA (40%).

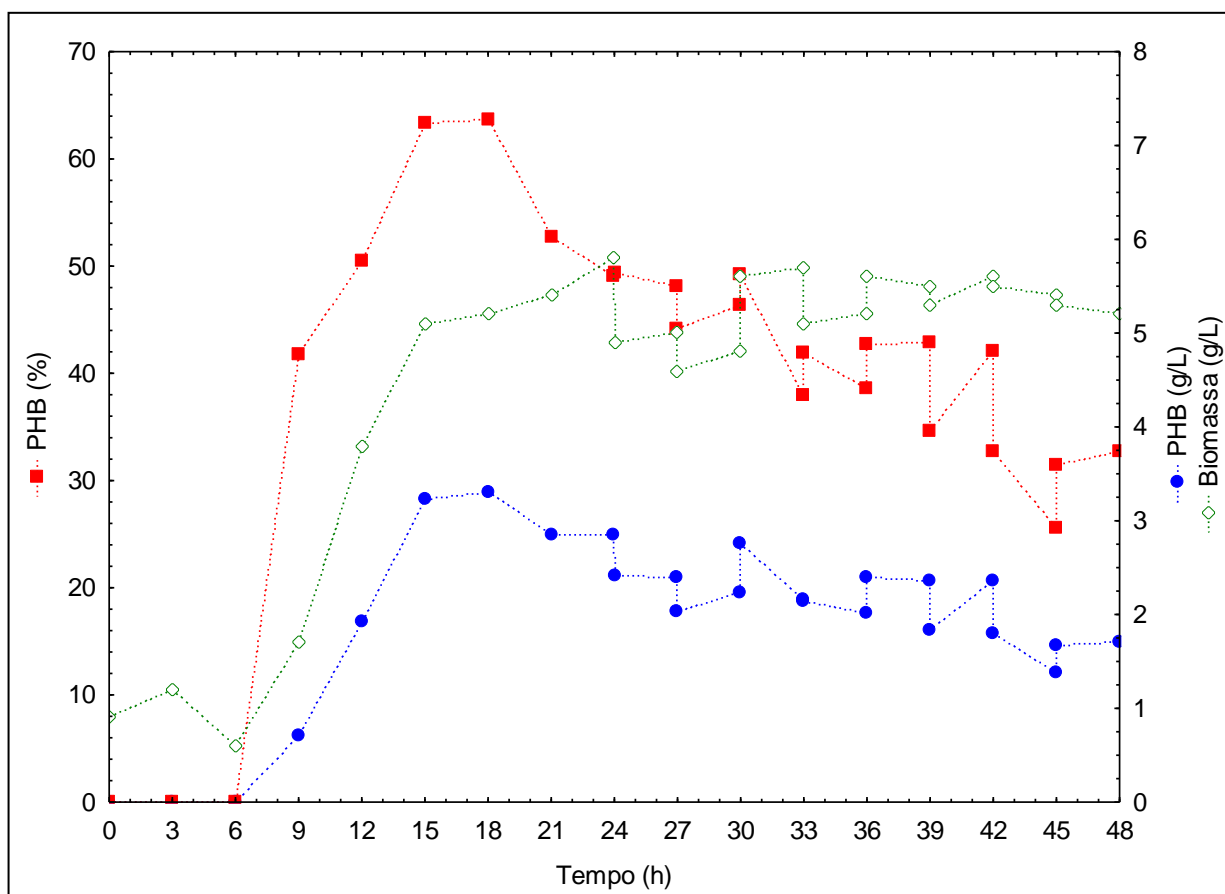


Figura 13- Cinética de bioprodução de P(3HB) e biomassa (g L^{-1} e %) em meio de cultivo composto por EIB (60 %) e APA (40 %).

A concentração máxima de biomassa foi de $5,80 \text{ g L}^{-1}$ e de P(3HB) de $2,85 \text{ g L}^{-1}$ (49,1%) em 24 h de cultivo. Ao comparar com a produção P(3HB) em meio a base de sacarose, houve uma redução de 0,7 % na concentração (g/L) e 33% no percentual de P(3HB), que está associado ao incremento de aproximadamente 50% de biomassa.

O comportamento cinético foi semelhante ao do meio à base de sacarose comercial, ou seja, também sofre oscilações na concentração de P(3HB) e concentração de biomassa total após 24 h de cultivo, reforçando a hipótese de que havendo limitações de nutrientes, em um meio com excesso de carbono, o *B. megaterium* consome os grânulos formados por P(3HB) como forma de evitar a morte celular.

Pillai *et al.* (2017), cultivaram *B. aryabhatai* em meio basal com glicose e obtiveram após 48 h, 4,36 g L⁻¹ de biomassa, com 74,89 % de P(3HB) (3,26 g L⁻¹). Contrastando os resultados obtidos no presente estudo, nota-se similaridade aos descritos na literatura, o que indica que a utilização da cepa *B. megaterium* ATCC 14581 torna-se viável para produção de P(3HB).

Comparando estes valores com outros encontrados na literatura, Saratale *et al.* (2021) cultivaram *Lysinibacillus* sp em meio mínimo com sacarose como fonte de carbono obtiveram 1,44 g L⁻¹ de P(3HB) em 4 h de cultivo e 2,65 g L⁻¹ ao utilizar glicose. Ao comparar o resultado obtido pelo autor com meio a base de sacarose este foi inferior ao obtido no presente estudo.

Hassemer *et al.* (2021) ao realizar o estudo utilizando os mesmos coprodutos agroindustriais nas mesmas proporções deste trabalho e condições semelhantes de cultivo, variando o tempo (32h) e utilizando sistema batelada simples, obteve resultados similares no que diz respeito a fase *Lag*, sendo está relativamente curta, com o crescimento exponencial das células começando a ocorrer após 4 h e se mantendo até aproximadamente 8 h, onde a partir deste ponto foi obtida a primeira amostra dentro do limite mínimo de detecção do método de quantificação. O valor encontrado pelos autores de biomassa foi de 7,55 g L⁻¹ após 32 h, em função do aumento da concentração de P(3HB). Já a maior concentração de produto foi de 3,78 g L⁻¹ (50,1% da massa seca total) em 32 h. Ao comparar o resultado obtido com os dos autores, verifica-se que concentração de P(3HB) foi de aproximadamente 25% inferior, porém em 24 h de cultivo.

Em decorrência do processo de bioprodução ter ocorrido no sistema de batelada alimentada, normalmente ocorre um incremento da produção pelo fornecimento progressivo de substratos após a fase de crescimento do microrganismo, onde a célula aproveitaria os nutrientes mais efetivamente e assim acumularia maior concentração de P(3HB) em seu interior. Neste sentido,

outras estratégias de alimentação de substratos em diferentes períodos de cultivo poderiam maximizar a concentração de P(3HB), para exemplificar, uma delas seria realizar as alimentações no início da fase de crescimento celular, em aproximadamente 9 h; outra seria avaliar diferentes relações C:N para esse tipo de cultivo, entre outras estratégias.

5.3 Parâmetros cinéticos e estequiométricos da produção de P(3HB) em biorreator batelada alimentada

Com base nas cinéticas de produção de *B. megaterium* utilizando o meio composto por 60% de sacarose comercial e 40% de APA (Meio 1) (Figura 12) e por 60% de EIB e 40% de APA (Meio 2) (Figura 13) alguns parâmetros cinéticos e estequiométricos foram obtidos.

A Figura 14 apresenta a produtividade global de P(3HB) e a cinética da conversão de célula em P(3HB) ($Y_{P/X}$) empregando ambos os meios como substrato. A máxima produtividade global de P(3HB) empregando sacarose comercial (Figura 14 A) foi de $0,15 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em 9 h de cultivo, após este período houve redução gradual, mais acentuada até 30 h.

No entanto ao utilizar meio composto por EIB e APA (Figura 14 B), a máxima produtividade global de P(3HB) foi de $0,22 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em 12 h. Na sequência, também, ocorreu uma diminuição gradual da produtividade, atingindo em 42 h, $0,04 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Correspondendo a um incremento de 32% na produtividade, quando comparado a fonte de carbono a base de sacarose comercial (Figura 14 A).

Tanadchangsaeng e Yu (2012) relataram aumento da produtividade de PHB ($0,92 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) por *C. necator* operando em batelada alimentada tendo glicerina como fonte de carbono.

O máximo fator $Y_{P/X}$ no cultivo utilizando o meio com sacarose comercial (Meio 1) (Figura 14 A) foi de $0,73 \text{ g g}^{-1}$ em 18 h e no cultivo com efluente da indústria de balas e água de parboilização de arroz (Meio 2) (Figura 14 B) a máxima conversão de célula em produto foi de $0,77 \text{ g g}^{-1}$ em 15 h de cultivo. Ao comparar os substratos empregados, há maior conversão ao utilizar os coprodutos agroindustriais, sendo que após 24 h há um decréscimo acentuado,

possivelmente pela alteração do metabolismo celular pelo excesso de substrato no meio e menor proporção de células para convertê-las em P(3HB).

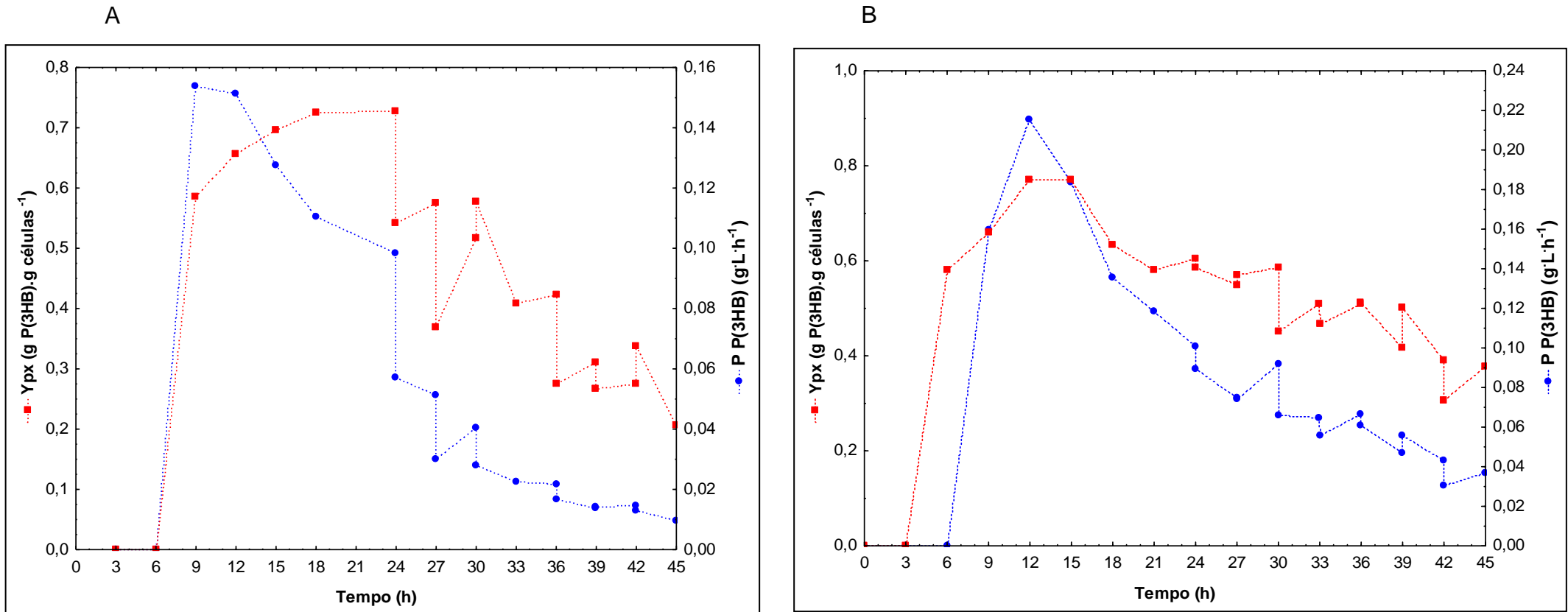
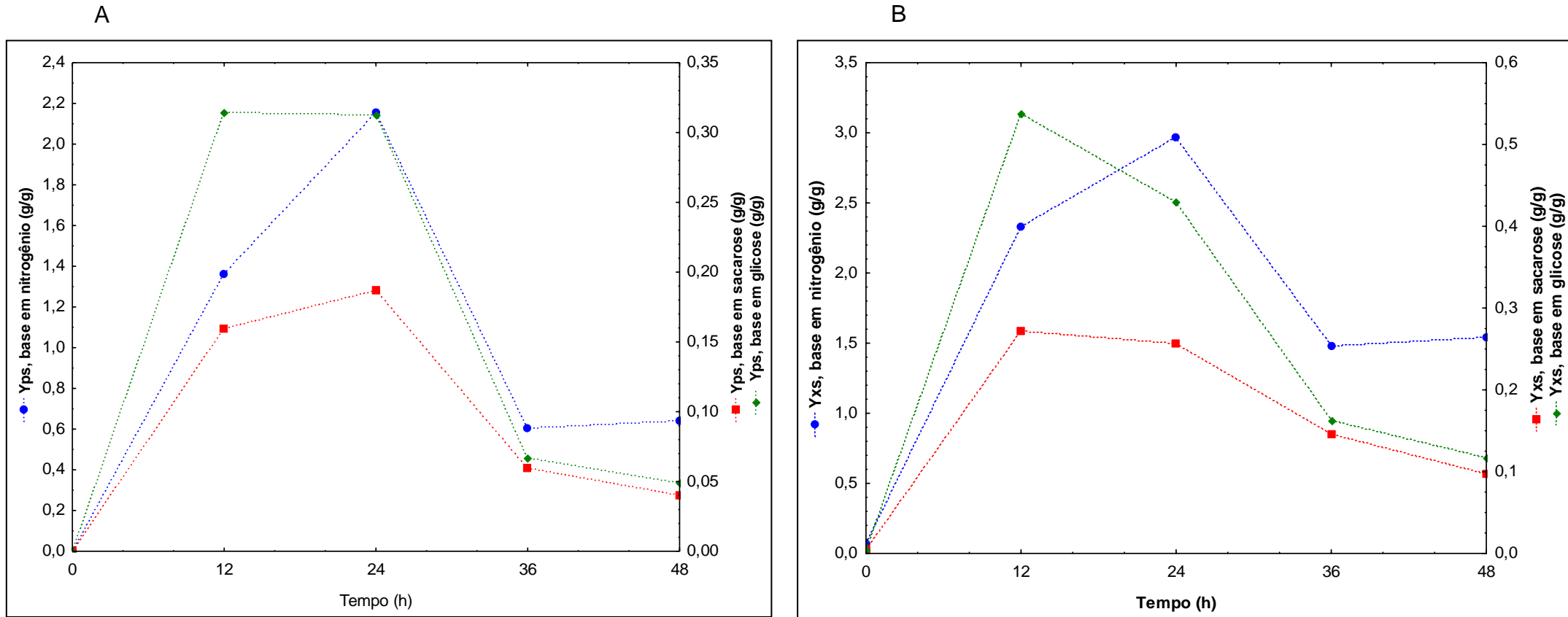


Figura 14- Produtividade global de P(3HB) e cinética da conversão de célula em P(3HB) ($Y_{P/X}$) ao longo da bioprodução em biorreator batelada alimentada com por 60% de sacarose comercial e 40% de APA (A) e por 60% de EIB e 40% de APA (B)

As Figuras 15 e 16(A-B) apresentam os fatores de conversão de substrato (nitrogênio total, sacarose e glicose) em produto e células utilizando meios a base de sacarose comercial e coprodutos agroindustriais.



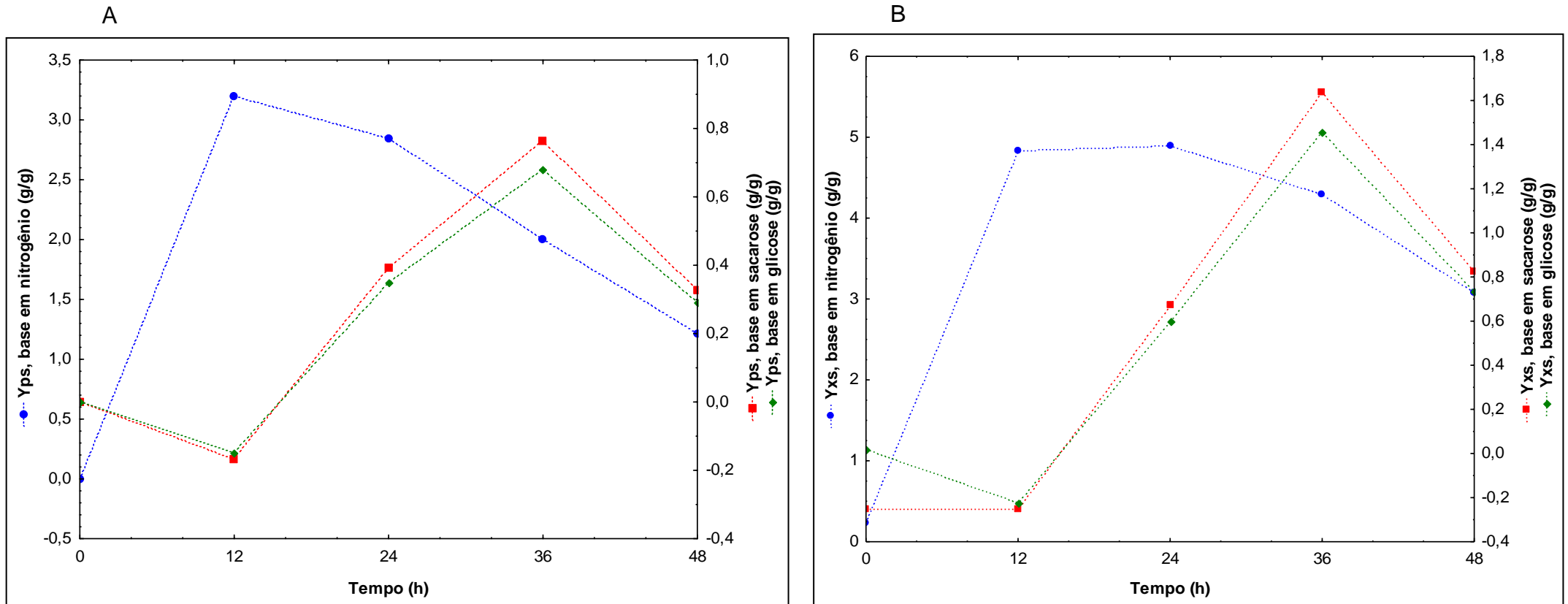


Figura 16- Cinética da conversão de nitrogênio, sacarose e glicose em produto (A) e célula (B) utilizando substrato a base de coprodutos agroindustriais (EIB+APA).

O maior fator de conversão de sacarose em P(3HB) foi de $0,19 \text{ g g}^{-1}$ em 24 h, glicose foi de $0,31 \text{ g g}^{-1}$ em 12 h e do nitrogênio de $2,15 \text{ g g}^{-1}$ em 24 h. Para conversão em células um comportamento semelhante foi observado para a glicose e nitrogênio, onde a maior conversão de destes substratos em célula foi de $0,54 \text{ g g}^{-1}$ em 12 h e $2,97 \text{ g g}^{-1}$ em 24 h de cultivo, respectivamente. No entanto, a sacarose foi convertida em célula ($0,27 \text{ g g}^{-1}$) em um menor tempo (12 h).

Os maiores fatores de conversão de substrato em P(3HB) obtidos utilizando o meio composto pelo efluente da indústria de balas e a água de parboilização foram de $0,77 \text{ g g}^{-1}$ em 36 h para a sacarose, $0,68 \text{ g g}^{-1}$ em 36 h para glicose e de $3,19 \text{ g g}^{-1}$ em 24 h para nitrogênio. Para conversão em células, obteve-se a maior conversão de $1,64 \text{ g g}^{-1}$ em 36 h para sacarose, $1,46 \text{ g g}^{-1}$ em 36 h para glicose e $4,90 \text{ g g}^{-1}$ de nitrogênio em 24 h de cultivo.

Na Tabela 6 são apresentados os fatores de conversão de substratos (nitrogênio, glicose e sacarose) em produto e célula, produtividade celular e em produto e velocidade específica de crescimento global no período de máxima conversão empregando como substratos sacarose comercial e efluente da indústria de balas.

Tabela 6- Parâmetros cinéticos e estequiométricos da bioprodução de P(3HB) por *B. megaterium* em biorreator do sistema batelada alimentada utilizando dois tipos de meios.

Parâmetros	Valor máximo obtido	Tempo de maior conversão (h)
Meio 1 (Sacarose comercial + APA)		
$Y_{P/Sn}$ (g·g ⁻¹) (Base em sacarose)	0,19	24
$Y_{X/Ss}$ (g·g ⁻¹) (Base em sacarose)	0,27	12
$Y_{P/Sg}$ (g·g ⁻¹) (Base em glicose)	0,31	12
$Y_{X/Sg}$ (g·g ⁻¹) (Base em glicose)	0,54	12
$Y_{P/Sn}$ (g·g ⁻¹) (Base em nitrogênio)	2,85	24
$Y_{X/Sn}$ (g/g) (Base em nitrogênio)	2,97	24
$Y_{P/X}$ (g/L.h)	0,73	18
P_x	0,26	9
μ_x (h ⁻¹)	0,33	12
Meio 2 (EIB + APA)		
$Y_{P/Sn}$ (g·g ⁻¹) (Base em sacarose)	0,77	36
$Y_{X/Ss}$ (g·g ⁻¹) (Base em sacarose)	1,64	36
$Y_{P/Sg}$ (g·g ⁻¹) (Base em glicose)	0,68	36
$Y_{X/Sg}$ (g·g ⁻¹) (Base em glicose)	1,46	36
$Y_{P/Sn}$ (g·g ⁻¹) (Base em nitrogênio)	3,19	12
$Y_{X/Sn}$ (g/g) (Base em nitrogênio)	4,90	24
$Y_{P/X}$ (g/L.h)	0,77	15
P_x	0,28	12
μ_x (h ⁻¹)	0,27	12

Os resultados máximos obtidos para a velocidade específica de crescimento global (μ_x) e a produtividade global em células (P_x) foram de 0,33 h⁻¹ em 12 h e 0,26 g L⁻¹ h⁻¹ em 9 h para o cultivo utilizando o meio 1 (sacarose comercial + APA) e 0,27 h⁻¹ e 0,28 g L⁻¹ h⁻¹ em 12 h para o cultivo com o meio 2 (EIB + APA), respectivamente.

Em condição onde há abundância de substrato, os microrganismos crescem com velocidade máxima ($\mu_{\text{máx}}$). Quando essa condição é invertida e não ocorreu inibição por substrato, o μ diminui, até atingir o valor zero ou próximo a isso, esgotando-se assim totalmente a concentração do substrato.

Os parâmetros cinéticos de conversão de substratos, tanto para produto quanto para célula, demonstraram que o microrganismo *B. megaterium* tem preferência pelo consumo das moléculas de glicose, ou seja, ele não consome a sacarose em sua forma pura, fazendo com que seja necessário secretar enzimas para quebrar essa molécula em glicose e frutose, dando preferência ao consumo da glicose. Desta forma, 1 g de glicose produz mais células do que a sacarose e conseqüentemente maior concentração de P(3HB).

No que se refere ao nitrogênio, há uma conversão maior em célula do que em produto. Isso se deve ao excesso de fonte de carbono, fazendo com que esse nitrogênio seja destinado a rota metabólica da produção de P(3HB) e não com tanta frequência para o Ciclo de Krebs, responsável pela manutenção celular. Esse comportamento é esperado nos cultivos de produção deste biopolímero.

Porém ao comparar com conversão de nitrogênio em célula ou produto relatados na literatura estes são superiores aos obtidos no presente estudo, que consumiu preferencialmente fontes de carbono (glicose e sacarose) em relação ao nitrogênio. Egli (2015) aponta que este comportamento é comum em sistemas de produção de P(3HB) onde há excesso de fonte de carbono, sendo que em certos casos, a taxa de conversão de nitrogênio em produto e/ou células pode atingir níveis de até 20,0 g g⁻¹. Oliveira-Filho *et al.* (2020) relatam fatores de conversão de NT em células de 7,5 g g⁻¹ para a produção de P(3HB) por *Burkholderia sacchari* LMG 19450, utilizando xilose como fonte de carbono. Khanna e Srivastava (2008) cultivaram *Ralstonia eutropha* NRRL B14690 em meio otimizado com frutose e obtiveram uma taxa de conversão de nitrogênio em biomassa de aproximadamente 10,01 g g⁻¹. Faccin *et al* (2011), ao cultivar *B. megaterium* DSM 3^T em meio mineral com sacarose, obtiveram fatores de conversão para célula próximos a 8,48 g g⁻¹.

Para a produção de PHB atingir viabilidade comercial, sua produção deve ser proveniente de fontes renováveis de baixo custo ou, até mesmo, sem custo

de aquisição. Desse modo, a produção proveniente do uso de resíduos agroindustriais pode ser uma alternativa interessante (ILES; MARTIN, 2013).

Levando em consideração que o custo do kg de sacarose é de aproximadamente R\$ 23,00 (Marca Neon), logo ao substituir a fonte de carbono (sacarose) por substrato a base de coprodutos da agroindústria (EIB e APA), há uma redução nos custos de aproximadamente R\$ 3,00 por litro de meio de cultivo utilizado na produção do biopolímero.

6 Conclusão

Na produção de P(3HB) por *B. megaterium* em sistema batelada alimentada (taxa da alimentação de 100 mL a cada 3 h de cultivo) empregando o EIB e a APA como substratos houve um incremento de 32% na produtividade global de P(3HB), maior conversão de célula em produto ($0,77 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e uma redução insignificante (0,7%) na concentração de P(3HB) em 24 h de cultivo, quando comparado ao meio a base de sacarose comercial. As velocidades específicas de crescimento global ($0,33$ e $0,27 \text{ h}^{-1}$ em 12 h) e de produtividade global em células ($0,26$ e $0,28 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) foram similares para ambos os substratos.

Os efluentes das indústrias de balas, confeitos (EIB) e/ou água de parboilização de arroz (APA) podem ser empregados na produção de P(3HB) por *B. megaterium* em sistema batelada alimentada, levando a redução de custo do processo de obtenção do polímero de aproximadamente R\$ 3,00 por litro de meio de cultivo utilizado na bioprodução. Além disso, torna-se uma alternativa de destinação para as indústrias, não necessitando do tratamento dos efluentes e desta forma contribuindo com o meio ambiente.

7. Sugestões de trabalhos futuros

Através da experiência adquirida neste trabalho acerca da bioprodução de P(3HB) em biorreator, podem-se sugerir alguns temas para trabalhos futuros:

1. Realizar diferentes estratégias de batelada alimentada (Taxas de alimentação) com meio a base de substratos agroindústria (EIB, APA), visando a maximização da produção de P(3HB);
2. Produzir P(3HB) em biorreator sistema semi-contínuo;
3. Recuperar o P(3HB) empregando tecnologia supercrítica;
4. Caracterizar o P(3HB) quanto a biodegradabilidade.

8. Referências

ABIAP - Associação Brasileira das Indústrias de Arroz. **O que diferencia o arroz branco do arroz parboilizado?** 2013.

Disponível em: <http://www.abiap.com.br/site-pt/content/informativos/detalhe.php?informativo_id=94>. Acesso em: 19 jan. 2021.

ALBUQUERQUE, R.M.B.; Desenvolvimento de uma blenda biodegradável á base de celulose bacteriana (cb) e polihidroxibutirato (PHB) para aplicação como embalagem ativa para alimentos. Dissertação (Mestrado em desenvolvimento de processos ambientais) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. 2019.

ARAI, Y. Synthesis of a Novel Class of Polyhydroxyalkanoates in Arabidopsis Peroxisomes, and Their Use in Monitoring Short-Chain-Length Intermediates of β -Oxidation. **Plant and Cell Phys.**, v. 43, n. 5, p. 555–562, 2002.

ASHTER, S. A. Introduction to bioplastics engineering. **Elsevier**, p. 286. 2016.

Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Cacau, Amendoim, Balas e Derivados, ABICAB. **Associados Balas e Derivados**. 2018.

AVEROUS, L.; BOQUILLON, N. Biocomposites based on plastificized starch: thermal and mechanical behavriours. **Carbo. Polym.**, v. 52, p. 111-122, 2004.

ANJUM, A.; ZUBER, M.; ZIA, K.M.; NOREEN, A.; ANJUM, M.N.; TABASUM, S. Produção microbiana de polihidroxicanoatos (PHAs) e seus copolímeros: uma revisão dos avanços recentes. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 89, p. 161 – 174. 2016.

ARAÚJO, R.; Aproveitamento da água de maceração de milho para produção de compostos bioativos por *Aspergillus Niger*. **E-xacta**, v.8, n.1, p. 15–29, 2015.

ARIAS, D.M.; GARCÍA, J.; UGGETTI, E. Production of polymers by cyanobacteria grown in wastewater: current status, challenges and future perspectives. **N. Biotechnol.**, v. 55, p. 46-57. 2020

BAILEY, J.; BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F.; SIMPSON, R. J.; OLLIS, D. F. **Biochem. Engin. Fundament.**. 2nd. ed. New York: McGraw-Hill, 1986.

BALAJI, S.; GOPI.K.; MUTHUVELAN, B. A review on production of poly- β -hydroxybutyrate from renewable resources. **Polym. Degrad.** v. 137. p. 35-57.

BHUWAL, A.K.; SINGH, G.; AGGARWAL, N.K.; GOYAL, V.; YADAV, A. Poly- β -hydroxybutyrate production and management of cardboard industry effluent by new *Bacillus* sp. NA10. **Bioresour. Bioprocess.**, v.1, p. 9. 2014.

BORGES, F. Avaliação do desempenho de solventes não-halogenados na extração do poli(3-hidroxibutirato) a partir de *Bacillus megaterium*. **Dissertação**

(Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M.; MELO, T. J. A. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revi. Ele. de Mat. e Proces.**, v. 6, n. 2, p. 127–139, 2011.

CANEVAROLO JUNIOR, S. **Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. 2 ed. São Paulo: Artliber Editora, 2006.

CARDOSO, L.O.B.; Produção de Polihidroxibutirato (PHB) por Bactérias Metilotróficas. **Dissertação de Mestrado**: Escola politécnica da Universidade de São Paulo. 2017.

CARMIGNAN, F. Desenvolvimento de microesferas de ibuprofeno a partir dos biopolímeros polihidroxialcanoatos. Estudo da influência das características físico-químicas das microesferas sobre o perfil de liberação do fármaco e degradação das partículas. **Dissertação (Mestrado em Farmácia)**. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC- 151f.-, Santa Catarina, 2006.

CHODAK, I.; Polyhydroxyalkanoates: Origin, Properties and Applications. Monomers, **Polymers and Composit. from Renew. Resour.** p.451-477. 2008.
CHOI, S.Y.; RHIE, M.N.; KIM, H.T.; JOO, J.C.; CHO, I.J.; SON, J.; JO, S.Y.; SOHN, Y.J.; BARITUGO, K-A.; PYO, J.; LEE, Y.; LEE, S.Y.; PARK, S.J. Metabolic engineering for the synthesis of polyesters: a 100-year journey from polyhydroxyalkanoates to non-natural microbial polyesters. **Metab. Eng.**, v.58, p. 47 – 81. 2020.

COLET, R.; URNAU, L.; BAMPI, J.; ZENI, J.; DIAS, B. B.; RODRIGUES, E.; JACQUES, R. A.; DI LUCCIO, M.; VALDUGA, E. Use of low-cost agro products as substrate in semi-continuous process to obtain carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor*. **Biocat. and agric. biotechnology**, v. 11, p. 268-274, 2017.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Safra 2019/20 - Quarto levantamento, Brasília, v. 7, p. 11-13. 2020.

DOMÍNGUEZ-DÍAZ, M.; MENESES-ACOSTA, A.; ROMO-URIBE, A.; PEÑA, C.; SEGURA, D.; ESPIN, G. Propriedades termo-mecânicas, microestrutura e biocompatibilidade em poli- β -hidroxibutiratos (PHB) produzidos por cepas OP e OPN de *Azotobacter vinelandii*. **EUR. Polym. J.** v.63, p. 101 – 112. 2015.

DWIVEDI, R.; PANDEY, R.; KUMAR, S.; MEHROTRA, D. Polihidroxialcanoatos (PHA): papel em estruturas ósseas **J. Oral Biol. Craniofac. Res.** v. 10, p. 389 – 392. 2020.

EGLI, T. Microbial growth and physiology: a call for better craftsmanship. **Front. in Microb.**, v. 06, p. 287, 2015.

FACCIN, D. J. L. **Avaliações das condições de cultivo para aumento da produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* e modelagem do bioprocesso.** 2012. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

FACCIN, D. J. L.; CORRÊA, M. P.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z.; SECCHI, A. R.; CARDOZO, N. S. M. Modeling P(3HB) production by *Bacillus megaterium*. **Jour. of Chemic. Tech. & Biotech.**, v. 87, n. 3, p. 325–333, 2011.

FAVARO L., BASAGLIA M., CASELLA S. Improving polyhydroxyalkanoate production from inexpensive carbon sources by genetic approaches: a review. **Biocom. Bioprod. Biorefining.** v. 13, p. 208-227. 2019.

FLIEGER, M.; KANTOROVÁ, M.; PRELL, A.; ŘEZANKA, T.; VOTRUBA, J. Biodegradable plastics from renewable sources. **Fol. Microb.**, v. 48, n. 1, p. 27–44, 2003.

GAYESKI, L. ; COLET, R. ; URNAU, L. ; BURKERT, Janaína Fernandes de Medeiros ; STEFFENS, C. ; VALDUGA, E. . Semi-continuous carotenoid production in bioreactor from *Phaffia rhodozyma* using agro-industrial residues. **Bioint. Resear. in app. Chem.**, v. 11, p. 7501-7510, 2021.

GOUDA, M.K.; SWELLAM, A.E.; OMAR, S.H. Produção de PHB por uma cepa de *Bacillus megaterium* usando melão de cana-de-açúcar e licor de maceração de milho como únicas fontes de carbono e nitrogênio. **Microbiol. Res.**, v. 156, p. 201 – 207. 2001.

GRAEBLING D.; MULLER R.; PALIERNE J.F.; Linear viscoelasticity of incompatible polymer blends in the melt relation with interfacial properties. **Am. J. Phys. Anthropol.** v 22. p. 15-25, 1993.

GRIGORE, M.E.; GRIGORESCU, R.M.; IANCU, L.; ION, R.M.; ZAHARIA, C.; ANDREI, E.R. Métodos de síntese, propriedades e aplicações biomédicas de polihidroxicanoatos: uma revisão. **J. Biomater Sci Polym Ed.** v. 30. p. 695–712. 2019.

GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, M. A. **Biopolymers for Food Design.** 1. ed. London: Academic Press, 2018.

HASSEMER, G. de S. Produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* Utilizando Permeado de Soro de Leite. **Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos).** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.

HASSEMER, G de S. Produção e recuperação de polihidroxibutirato (P(3HB)) por *Bacillus megaterium* ATCC 14581 empregando coprodutos da agroindústria. **Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos).** Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2021.

HASSEMER, G. de S.; COLET, R.; MELO, R.N.; FISCHER, B.; LIN, Y-H.; JUNGES, A.; VALDUGA, E. Production of Poly(3-hydroxybutyrate) (P(3HB)) from

Different Agroindustry Byproducts by *Bacillus megaterium*. **Bioint. Res. In App. Chem.**, v. 11, p. 14278-14289, 2021.

HAZER, B.; STEINBÜCHEL, A. Maior diversificação de polihidroxicanoatos por reações de modificação para aplicações industriais e médicas. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 74. p.1–12. 2007.

HOLMES, P. A. Applications of PHB- A microbially produced biodegradable thermoplastic. **Physical Technology**, v. 16, p. 32-36, 1985.

HONG, S. G.; LIN, Y. C.; LIN, C. H. Crystallization and degradation behaviors of treated polyhydroxybutyrates. **React. and Funct. Polym.**, v. 68, n. 11, p. 1516–1523, 2008.

ILES, A.; MARTIN, N. A. Expanding bioplastics production: sustainable business innovation in the chemical industry. **Jour. of Clean. Produc.**, v.45, p.38-49. 2013.

INOUE, D.; FUKUYAMA, A.; REN, Y.; IKE, M.; Enriquecimento rápido de bactérias que acumulam polihidroxicanoato pelo processo de descarga dinâmica aeróbia: eficácia de enriquecimento, capacidade de acumulação de polihidroxicanoato e características da comunidade bacteriana em comparação com o processo de alimentação dinâmica aeróbia **Bio. Tec. Rep.** v.7, p. 100276, 2019.

JACQUEL, N.; L.O, C.W.; WEI, Y.H.; WU, H.S.; Isolation and Purification of Bacterial Poly(3-Hydroxyalkanoates). **Bio. Engin. Jour.** v. 39. p. 15-27. 2008.
JOHNSTON, B.; RADECKA, I.; HILL, D.; CHIELLINI, E.; ILIEVA, V.I.; SIKORSKA, W.; MUSIOŁ, M.; ZIĘBA, M.; MAREK, A.A.; KEDDIE, D.; MENDREK, B.; DARBAR, S.; ADAMUS, G.; KOWALCZUK M. A produção microbiana de polihidroxicanoatos a partir de fragmentos de resíduos de poliestireno obtidos por degradação oxidativa. **Polím. (Basel)**. 2018.

KABASCI, S. Bio-Based Plastics - Introduction. **Bio-Based Plast. Mater. Appl.** 1. Ed.: John Wiley & Sons, Ltd, 2014. p. 1–7.

KABIR, E.; KAUR, R.; LEE, J.; KIM, K-H.; KWON, E.E.; Perspectivas da tecnologia de biopolímero como opção para plásticos não degradáveis e gestão sustentável de resíduos plásticos. **Jour. of Clean. Produc.** v. 258. 2020.

KAPRITCHKOFF, F.M.; VIOTTI, A.P.; ALLI, R.C.P.; ZUCCOLO, M.; PRADELLA, J.G.C.; MAIORANO, A.E.; MIRANDA, E.A.; BONOMI, A. Recuperação enzimática e purificação de polihidroxibutirato produzido por *Ralstonia eutropha*. **J Biotechnol.** v. 122. p. 453–462. 2006.

KARLSSON, S.; ALBERTSSON, A. C. Biodegradable polymers and environmental interaction. **Polym. Engin. and Sci.**, v. 38, n. 8, p. 1251– 1253, 1998.

KESHAVARZ, T.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. **Curr. Opin. Microbiol.** v. 3, p. 321 – 326. 2010.

KESSLER, B.; WEUSTHUIS, R.; WITHOLT, B.; EGGINK, G. Production of microbial polyesters: fermentation and downstream processes. **Biopolyesters**, v. 71, p. 159-182. 2001.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Proc. Biochem.**, v. 40, n. 2, p. 607–619, 2005.

KHIYAMI, M.A.; AL FADUAL, S.M.; BAHKLIA, A.H. Produção de poli-hidroxiálcanoatos via biofilme de suporte de composto plástico *Bacillus* (PCS) e xarope de tamareira. **J. Med. Plants Res.** V.5, p. 3312–3320, 2011.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H.; BOHN, Andreas. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Ange. Chem.**, v. 44, n. 22, p. 3358–93, 2005.

KOLLER, M.; BRAUNEGG, G. Produção biomediada de poli (hidroxialcanoatos) estruturalmente diversos de fluxos excedentes da indústria de processamento animal. **Polim.**, v.60, p. 298 – 308. 2015.

KOLLER, M. Switching from petro-plastics to microbial polyhydroxyalkanoates (PHA): the biotechnological escape route of choice out of the plastic predicament? **Eurobiot. J.**, v. 3, p. 32-44. 2019.

KOLLER, M.; MARSALEK, M.M.S.D., BRAUNEGG, G. Produção de biopoliésteres de polihidroxiálcanoato microbiano (PHA) de maneira sustentável. **New Biotech.** v. 37, p. 24- 38. 2017.

KOSSEVA, M. R.; RUSBANDI, E. Trends in the biomanufacture of polyhydroxyalkanoates with focus on downstream processing. **Intern. Jour. of Biolog. Macrom.**, v. 107, p. 762–778, 2018.

KUMAR, D.; SINGH, B. Sustainable Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Using Biomass-Based Growth Substrates, Valorization of Biomass to Value-Added Commodities. **Springer**, p. 245-259. 2020.

KUNASUNDARI B.; SUDESH, K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. **Express Polym. Lett.** v. 5. p. 620–634. 2011.

LACERDA, K. A.; SILVA, W. M.; VILELA, J. J.; SANTOS, A. A.; LAMEIRAS, F. S.; FURTADO, C. A. Influência da relação estequiométrica resina/endurecedor em propriedades mecânicas de compósitos ternários hierárquicos resina - epóxi/tecido de fibra de carbono/nanotubos de carbono. **Polím.**, p. 222-227. 2014.

LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotech. and Bioeng.** v. 49, p. 1-14, 1996.

LUNA- FLORES, C. H.; RAMÍREZPCORDOVA, J.J.; PELAYOPORTIZ, C.; FEMAT, R.; HERRERAPLÓPEZ, E.J. Batch and fed-batch modeling of

carotenoids production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* using Yucca fillifera date juice as substrate. *Biochem. Engin. Jour.* v. 53, p.131–136, 2010.

LUTZ, Instituto Adolfo. **Métodos Físico-químicos Para Análise de Alimentos.** 4ª edição ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

MAHENDHRAN, K.; ARTHANARI, A.; DHEENADAYALAN, B.; RAMANATHAN, M. Bioconversão de resíduos oleosos de esgoto em poli-hidroxitirato (PHB) por *Ochrobactrum intermedium* marinho. **Bioresour. Technol. Rep.** v. 4, p. 66 – 73. 2018.

MANO, E.B.; MENDES, L. C. **Introd. a polím.** 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2004.

MAQBOOL, F.; BHATTI, Z. A.; NAZIR, H.; QAYYUM, S.; ZHAO, Y. G.; KHAN, I.; KAMAL, R.; PERVEZ, A. Confectionary wastewater treatment through upflow microbial fuel cell. **Desal. and Water Treat.**, v. 99, p. 248–254, 2017.

MANOWATTANA, A.; TECHAPUN, C.; WATANABE, M.; CHAYASO, T. Bioconversion of biodiesel-derived crude glycerol into lipids and carotenoids by an oleaginous red yeast *Sporidiobolus pararoseus* KM281507 in a airlift bioreactor. **J. of Bios. and Bioengin.**, v. 125, p. 59-66, 2018.

MARULANDA-AGUIRRE, A.; AZCON, R.; RUIZ-LOZANO, J.M.; AROCA, E.R. Efeitos diferenciais de uma cepa de *Bacillus megaterium* no crescimento da planta *Lactuca sativa* dependendo da origem do fungo micorrízico arbuscular co-oculado: características fisiológica e bioquímicas. **J. Plant. Growth Regul.** v.27. p. 1-10. 2008.

MATA-GÓMEZ, L.C.; MONTANEZ, J.C.; MÉNDEZPSAVALA, A.; AGUILAR, C.N. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. **Microb. cell fact.**, v. 13, p. 13-23, 2014.

MEARS, L.; STOCKS, S.M.; SIN, G.; GERNAEY, K.V. A review of control strategies for manipulating the feed rate in fed-batch fermentation processes. **J. of Biotech.**, v. 245, p. 34-46, 2017.

MIAH, J. H.; GRIFFITHS, A.; MCNEILL, R.; HALVORSON, S.; SCHENKER, U.; ESPINOZA-ORIAS, N. D.; MORSE, S.; YANG, A.; SADHUKHAN, J. Environmental management of confectionery products: Life cycle impacts and improvement strategies. **J. of Clean. Product.**, v. 177, p. 732–751, 2018.

MIDDLETON, J.C; TIPTON, A.J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biom.**, 2000.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analyt. Chem.**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOZEJKO-CIESIELSKA, J.; SZACHERSKA, K.; MARCINIAK, P. *Pseudomonas* Species as produtoras de polihidroxicanoatos ecológicos. **J. Polym. Environ.** v. 27. p.1151–1166. 2019.

MONDARDO, J.N.; Diagnóstico de tratamento de efluente de uma indústria de parboilização de arroz. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Universidade Federal de Santa Catarina Curso de Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental. 2018.

MUKHERJEE, C.; CHOWDHURY, R.; SUTRADHAR, T.; BEGAM, M.; GHOSH, S. M.; KUMAR BASAK, S.; RAY, K. Parboiled rice effluent: A wastewater niche for microalgae and cyanobacteria with growth coupled to comprehensive remediation and phosphorus biofertilization. **Alg. Res.**, v. 19, p. 225-236, 2016.

MUTIARA, I.; RAZAAD, N.; L. I. Y.; ZHAO, L.; MO, Y.; WANG, J. Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. **Polym.**, v. 6, p. 706–754, 2014.

NARODOSLAWSKY, M.; SHAZAD, H.S.K.; KOLLMANN, R. LCA de produção de PHA - identificando o potencial ecológico do bioplástico. **Chem. Biochem. Eng. Q.** v. 29, p. 299 – 305. 2015.

NDUBUISI EZEJIOFOR, T. I.; ENEBAKU, U. E.; OGUEKE, C. Waste to Wealth- Value Recovery from Agro- food Processing Wastes Using Biotechnology: A Review. **British Biotech. Jour.**, v. 4, n. 4, p. 418–481, 2014.

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

OLIVEIRA-FILHO, E. R.; SILVA, J. G. P.; DE MACEDO, M. A.; TACIRO, M. K.; GOMEZ, J. G. C.; SILVA, L. F. Investigating Nutrient Limitation Role on Improvement of Growth and Poly(3-Hydroxybutyrate) Accumulation by *Burkholderia sacchari* LMG 19450 From Xylose as the Sole Carbon Source. **Front. in Bioeng. and Biotech.**, v. 7, p. 476, 2020.

PAKALAPATI, H.; CHANG, C.K.; SHOW, P.L.; ARUMUGASAMY, S.K.; L., J.C.W. Desenvolvimento da produção de polihidroxicanoatos a partir de resíduos de matérias-primas e aplicações. **J. Biosci. Bioeng.** v.126, p. 282 – 292. 2018.

PAOLI, M. A De. Degradação e estabilização de polímeros. 2. ed.: **Chem.**, 2008.

PAPADAKI, A.; FERNANDES, K. V.; CHATZIFRAGKOU, A.; AGUIEIRAS, E. C. G.; DA SILVA, J. A. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PAPANIKOLAOU, S.; KOUTINAS, A.; FREIRE, D. M. G. Bioprocess development for biolubricant production using microbial oil derived via fermentation from confectionery industry wastes. **Biores. Techn.** v. 267, p. 311–318, 2018.

PARK, S. J.; KIM, T. W.; KIM, M. K.; LEE, S. Y.; LIM, S. C. Advanced bacterial polyhydroxyalkanoates: Towards a versatile and sustainable platform for unnatural tailor-made polyesters. **Biotech. Adv.**, v. 30, n. 6, p. 1196–1206, 2012.

PASSANHA, P.; ESTEVES, S.R.; KEDIA, G.; DINSDALE, R.M.; G., A.J. Increasing polyhydroxyalkanoate (PHA) yields from *Cupriavidus necator* by using filtered digestate liquors. **Bioresour. Technol.**, v. 147, p. 345-352. 2013.

PAVAN, F. A.; JUNQUEIRA, T. L.; WATANABE, M. D. B.; BONOMI, A.; QUINES, L. K.; SCHMIDELL, W.; DE ARAGAO, G. M. F. Economic analysis of polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator* using different routes for product recovery. **Biochem. Engin. Jour.**, v. 146, p. 97–104, 2019.

PELIZER L.H.; PONTIERI M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **J. Technol. Manag. Innov.** v.2, 2007.

PILLAI, A. B.; KUMAR, A. J.; THULASI, K.; KUMARAPILLAI, H. Biotechnology and Industrial Microbiology Evaluation of short-chain-length polyhydroxyalkanoate accumulation in *Bacillus aryabhatai*. **Brazi. Jour. of Microb.**, v. 48, p. 451–460, 2017.

POTTER, M.; MADKOUR, M.H.; MAYER, F.; STEINBUCHER, A. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. **Microbiology** 148: 2413–2426. 2002.

PU, N.; HU, P.; SHI, L.L.; LI, Z.J. Produção microbiana de poli (3-hidroxibutirato) a partir de ácidos graxos voláteis usando a bactéria marinha *Neptunomonas concharum*. **Relat. de Tecn. Biores.** v.11. 2020

PUSKAS, J. E.; HELFER, C. A. Natural Rubber Biosynthesis: Still a Mystery. **Rub. Chem. and Techn.**, v. 91, n. 4, p. 683–700, 2018.

RAZA, Z.A.; TARIQ, M.R.; MAJEED, M.I.; BANAT, I.M. Desenvolvimentos recentes na produção em escala de biorreator de polihidroxialcanoatos bacterianos. **Bioprocess Biosyst. Eng.** v. 42. p. 901–919. 2019.

RAZA, Z.A.; ABID, S.; BANAT, I.M. Poli-hidroxialcanoatos: características, produção, desenvolvimentos recentes e aplicações. **Int. Biodeterior. Biodegrad.** v. 126. P.45–56. 2018.

RATHIKA, R.; JANAKI, V.; SHANTHI, K.; KAMALA-KANNAN, S. Bioconversão de efluentes agroindustriais para produção de polihidroxialcanoatos utilizando *Bacillus subtilis* RS1. **Int. J. Environ. Sci. Technol.**, v. 16, p. 5725 – 5734. 2019.

RODRÍGUEZ-CONTRERAS, A.; KOLLER, M.; MIRANDA-DE SOUSA DIAS, M.; CALAFELL-MONFORT, M.; BRAUNEGG, G.; MARQUÉS-CALVO, M. S. High production of poly(3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* Bolivian strain. **Jour. of app. Microb.**, v. 114, n. 5, p. 1378–87, 2013.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, S.; SERRANO, A.; PANTIÓN, A.A.; ALONSO-FARIÑAS, B. Desafios de aumentar a produção de PHA a partir de fluxos de resíduos. Uma revisão. **J. Env. Manag.** v. 205, p. 215 – 230. 2018.

SADASIVUNI, K.K.; SAHA, P.; ADHIKARI, J.; DESHMUKH, K.; AHAMED, M.B.; CABIBIHAN, J.J.; Avanços recentes nas propriedades mecânicas de compósitos de biopolímero: uma revisão. **Polym. Compos.** p. 1 – 28. 2019.

SARATALE, G.D.; BHOSALE, R.; SHOBANA, S.; BANU, J.R.; PUGAZHENDHI, A.; MAHMOUD, E.; SIROHI, R.; BHATIA, S.K.; ATABANI, E.; MULONE, V.; YOON, J.J.; SHIN, H.S.; KUMAR, G. A review on valorization of spent coffee grounds (SCG) towards biopolymers and biocatalysts production. **Bioresour. Technol.**, v. 314. p. 123800. 2020a.

SARATALE, G.D.; SARATALE, R.G.; VARJANI, S.; CHO, S.K.; GHODAKE, G.S.; KADAM, A.; MULLA, S.I.; BHARAGAVA, R.N.; KIM, D.S.; SHIN, H.S.; Development of ultrasound aided chemical pretreatment methods to enrich saccharification of wheat waste biomass for polyhydroxybutyrate production and its characterization. **Ind. Crops Prod.** v 150. p.150. 2020b.

SATHIYANARAYANAN, G.; KIRAN, G. S.; SELVIN, J.; SAIBABA, G. Optimization of polyhydroxybutyrate production by marine *Bacillus megaterium* MSBN04 under solid state culture. **Internat. Journal of Biolog. Macrom.**, v. 60, p. 253-261. 2013.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.; AQUARONE, E. BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: Engenharia Bioquímica.** São Paulo: Editora Blücher, v. 2, 2001.

SOARES, H. R. NETO, E. B.; BARRETO, L. P.; LIRA, R.M.; LUCENA, E. H. L.; LIMA, N. S.; SILVA, M. A. **Comparação de metodologias para determinação de n-total em tecido vegetal.** XIII Jornada de ensino, pesquisa e extensão – JEPEX 2013 – UFRPE: Recife. 2017.

SOHN, S.B.; KIM, T.Y.; PARK, J.M.; LEE, S.Y. In silico genome-scale metabolic analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 for polyhydroxyalkanoate synthesis, degradation of aromatics and anaerobic survival. **Biotechnol. J.**, v. 5, p. 739-750. 2010.

STEINBÜCHEL, A.; EVERSLOH, L. T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Bioch. Engin. Journal**, v. 16, p. 81-96, 2003.

SUAREZ, C. A. G.; MONTANO, I. D. C.; NUCCI, E. R.; IEMMA, M. R.C.; GIORDANO, R. L. C.; GIORDANO, R. C. Assessment of the Metabolism of Different Strains of *Bacillus megaterium*. **Brazil. Arch. of Bio. and Tech.**, v. 55, n. 4, p. 485–490, 2012.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Prog. Polym. Sci.**, 25, p.1503, 2000.

TALAN, A.; KAUR, R.; TYAGI, R.D.; DROGUI, P.; Bioconversão de resíduos oleosos em polihidroxialcanoatos: tecnologia sustentável com abordagem de bioeconomia circular e impactos multidimensionais. **Bioresour. Technol. Rep.** v. 11, p. 100496. 2020.

TANADCHANGSAENG, N.; YU, J. Microbial Synthesis of Polyhydroxybutyrate from Glycerol: Gluconeogenesis, Molecular Weight and Material Properties of Biopolyester. **Biotec. and Bioeng.**, n. 11, v. 109, p. 2808-2818, 2012.

TANG, Z.; HE, C.; TIAN, H.; DING, J.; HSIAO, B.S.; CHU, B.; CHEN, X. Polymeric nanostructured materials for biomedical applications. **Prog. in Polym. Sci.**, v. 60, p. 86–128, 2016.

THOMAS, S.; BALAKRISHNAN, P.; SREEKALA, M. S. **Fund. Bio.: Polym.** 1. ed. Amsterdam: Woodhead Publishing, 2018.

TSANG, Y.F.; KUMAR, V.; SAMADAR, P.; YANG, Y.; LEE, J.; OK, Y.S.; SONG, H.; KIM, K.H.; KWON, E.E.; JEON, Y.J. Production of bioplastic through food waste valorization. **Environ. Int.**, v. 127, p. 625-644. 2019.

URNAU, L.; COLET, R.; GAYESKI, L.; REATO, P. T.; BURKERT, J. F. M.; KLEIN, T.; RODRIGUES, E.; JACQUES, R. A.; STEFFENS, C.; VALDUGA, E. Fed-batch carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* Y-17268 using agroindustrial substrates. **Bioint. Resear. in app. Chem.**, v. 10, p. 5348-5354, 2020.

VARY, P.S.; BIEDENDIECK, R.; FUERCH, T.; MEINHARDT, F.; ROHDE, M.; DECKWER, W.D.; JAHN, D. *Bacillus megaterium* - de simples bactéria do solo a hospedeiro industrial de produção de proteína. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 76, p. 957–967.2007.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. Polímeros. **Ciênc. e Tecn.** v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

WINKWORTH-SMITH, C.; FOSTER, T.J.; Visão geral dos biopolímeros: estrutura, propriedades e aplicações. **Hand. of Biop. Bas. Mater.** p. 7 – 36. 2013.

WHITMAN, W.; VOS, P.; GARRITY, G.; JONES, D.; KRIEG, N.R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F.A.; SCHLEIFER, K.H. Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey's. **Springer-Verlag** Nova York, v. 3. 2009.

WORLD WIDE FUND FOR NATURE. **Solucionar a Poluição Plástica:** Transparência e Responsabilização. Genebra: Dalberg, 2019.

YANG, J.E.; CHOI, Y.J.; LEE, S.J.; KANG, K.H.; LEE, H.; OH, Y.H.; LEE, S.H.; PARK, S.J.; LEE, S.Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for

biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 98, p. 95-104. 2014.

YEO, J. C. C.; MUIRURI, J. K.; THITSARTARN, W.; LI, Z.; HE, C. Recent advances in the development of biodegradable PHB-based toughening materials: approaches, advantages and applications. **Mater. Sci. Eng. C**. 2018.

YU, J.; STAHL, H. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 8042 – 8048. 2008.

ZHANG, B.; CARLSON, R.; SRIENC, F. Engineering the monomer composition of polyhydroxyalkanoates synthesized in *Saccharomyces cerevisiae*. **App.and environ. Microb.**, v. 72, n. 1, p. 536–43, 2006.

ZINN, M.; WITHOLT, B.; EGLI, T. Occurrence synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 53, n.1, p. 5-11, 2001.

ZHONG, Y.; GODWIN, P.; JIN, Y.; XIAO, H.; Polímeros biodegradáveis e materiais de embalagem antimicrobianos de base verde: uma mini revisão. **Pesq. Avan. de polím. Ind. e de Eng.** v. 3, ed. 1. p. 27-35. 2020.

9. Apêndice I

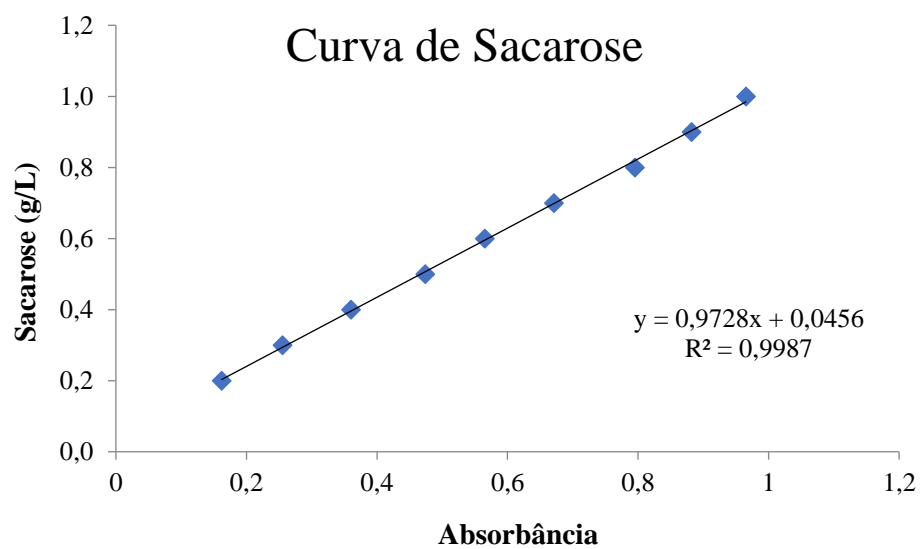


Figura 17- Curva de calibração sacarose

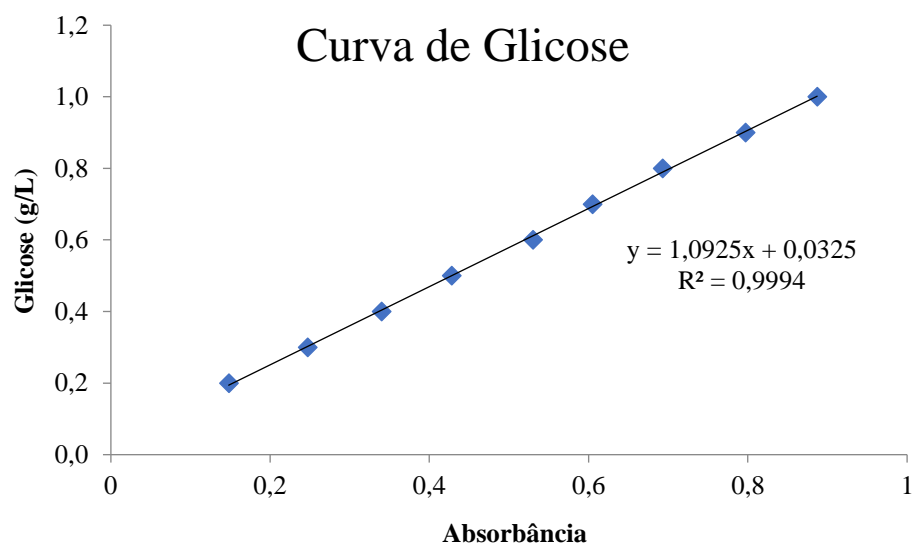


Figura 18- Curva de calibração glicose