

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA EM NOVO HAMBURGO
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA**

VANESSA KRISTINE DE OLIVEIRA SCHMIDT

**PRODUÇÃO DE [P(3HB)] POR *Bacillus megaterium* UTILIZANDO COMO
FONTE DE CARBONO HIDROLISADO DE CASCA DE ARROZ E GLICEROL
RESIDUAL**

NOVO HAMBURGO

2019

VANESSA KRISTINE DE OLIVEIRA SCHMIDT

**PRODUÇÃO DE [P(3HB)] POR *Bacillus megaterium* UTILIZANDO COMO
FONTE DE CARBONO HIDROLISADO DE CASCA DE ARROZ E GLICEROL
RESIDUAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia na Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profª Dra. Lilian Raquel Hickert Cruz

Corientadora: Profª Dra. Evelise Fonseca Santos

NOVO HAMBURGO

2019

Catálogo de Publicação na Fonte - CIP

S349p Schmidt , Vanessa Kristine de Oliveira

Produção de [P(3HB)] por *Bacillus megaterium* utilizando como fonte de carbono hidrolisado de casca de arroz e glicerol residual. / Vanessa Kristine de Oliveira Schmidt . – Novo Hamburgo, 2019.

71 f.

Orientadora: Prof^a Dra. Lilian Raquel Hickert Cruz

Coorientadora: Prof^a Dra. Evelise Fonseca Santos

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Curso Superior Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Unidade de Novo Hamburgo, 2019.

1. Biopolímero. 2. Biotransformação . 3. *Bacillus megaterium*. 4. Trabalho de Conclusão de Curso. I. Cruz, Lilian Raquel Hickert. II. Santos, Evelise Fonseca. III. Título.

VANESSA KRISTINE DE OLIVEIRA SCHMIDT

**PRODUÇÃO DE [P(3HB)] POR *Bacillus megaterium* UTILIZANDO COMO
FONTE DE CARBONO HIDROLISADO DE CASCA DE ARROZ E GLICEROL
RESIDUAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como
requisito parcial para obtenção do título de Bacharel
em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia na
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof^a Dra. Lilian Raquel Hickert

Coorientadora: Prof^a Dra. Evelise Fonseca Santos

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a Dra. Lilian Raquel Hickert

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul - UERGS

Co-orientadora: Prof^a Dra. Evelise Fonseca Santos

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul - UERGS

Prof^a Dra. Ana Lúcia Kern

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul - UERGS

Prof^a MSc. Cristiane Cassales Pibernat

Universidade Estadual do Rio Grande do Sul - UERGS

*Aos meus pais Regina, Gerson e meu irmão Diogo,
que não mediram esforços para que a graduação
se tornasse um sonho possível, intensificando a
minha vontade de ser uma pessoa melhor todos os
dias. Com todo o meu amor e gratidão, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer e dedicar este trabalho as seguintes pessoas:

Aos meus pais Regina e Gerson, e meu irmão Diogo, pelo suporte e dedicação, sendo a minha base nos momentos mais difíceis. Amo muito vocês e tenho orgulho de fazer parte desta família (sempre nós quatro contra o mundo).

Ao meu padrinho Lauri, que esteve sempre presente, acreditando e apostando em mim. Foi uma pessoa muito importante para que este sonho se concretizasse.

A minha orientadora Profa. Dra. Lilian e co-orientadora Profa. Dra. Evelise por acreditarem no meu potencial, pela oportunidade de trabalharmos em conjunto, seus ensinamentos e conselhos foram o que possibilitaram a conclusão deste trabalho. São exímias profissionais.

A Profa. MSc. Cristiane pelos seus ensinamentos e conselhos dentro e fora de sala de aula. As técnicas de laboratório Andréa e Arethuzza, pela ajuda, amizade e convivência no laboratório. Vocês foram essenciais neste período de aprendizado.

As minhas amigas, Brisa e Roseli pelo acolhimento, compreensão e por estarem sempre presente em toda a minha trajetória acadêmica e principalmente na vida me apoiando e ajudando nos momentos felizes e em outros nem tanto, vocês são incríveis.

As colegas de laboratório, que me deram apoio e tornaram a rotina de trabalho mais leve: Vanessa, Luiza e Louise que se demonstraram pessoas amistosas neste período, obrigada pelo companheirismo; Bárbara, Hediane, Leda, Luana, Nathália, Níverson, Paola, Simone, Thais e Victória, que durante a graduação tive muito carinho e amizade, agradeço o apoio que me dão até hoje, muito obrigada por tudo que vivemos juntos nestes anos de graduação.

A Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, pela infraestrutura para realização do trabalho proposto e por se tornar a extensão do meu lar. Agradeço ao doutorando Paulo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo apoio na realização das análises cromatográficas. Ao Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub pelo fornecimento da cultura e estrutura do Bioteclab para a realização das análises. E a equipe técnica do Laboratório Multiusuário de Análise Térmica (LAMAT), pelo auxílio na caracterização do biopolímero. Agradeço aos demais professores, funcionários e colegas que contribuíram para a construção da minha formação acadêmica.

“Eis o meu segredo: só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos. Os homens esqueceram essa verdade, mas tu não a deves esquecer.”

Antoine de Saint-Exupéry
(O Pequeno Príncipe, 1943)

RESUMO

O poli(3-hidroxi-butirato) ou P(3HB) é um poliéster biodegradável sintetizado intracelularmente por microrganismos e pode ser produzido a partir de matérias primas de fontes renováveis. Entretanto, a produção deste poliéster por via biotecnológica ainda é restrita devido ao seu alto custo. A utilização de resíduos agroindustriais como substrato tem como principal objetivo viabilizar economicamente o processo de produção deste poliéster e agregar valor ao resíduo. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi à otimização dos processos tecnológicos para aumentar a produção de P(3HB) pelo *B. megaterium*, utilizando hidrolisado de casca de arroz (HCA) e glicerol residual como fontes de carbono (FC). O cultivo foi realizado por fermentação submersa por 72 horas em agitador orbital tipo *shaker* a 180 rpm a 30° C. Em erlenmeyers de 250 mL foram adicionados 100 mL de meio sintético com 10% do volume em inóculo com o pH 7,0. A cada 12 horas alíquotas foram retiradas dos cultivos, a fim de avaliar o crescimento celular. Para o cultivo em HCA foi necessária à realização de diluições seriadas e plaqueamento para contagem de células viáveis. Para todos os cultivos a cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizada na identificação da concentração de açúcares. Os resultados do crescimento de biomassa mostraram que a bactéria, quando cultivada por 72 h à 30°C, apresentou desempenho de crescimento muito similar nos meios contendo FC padrão e glicerol residual. A extração foi realizada com solventes alternativos, apresentando um bom desempenho. Além disso, as amostras de P(3HB) foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho (FTIR) e calorimetria exploratória diferencial (DSC), evidenciando a produção de P(3HB) e possíveis co-polímeros. No decorrer da pesquisa foi observado que devido à utilização de um tempo maior de esterilização foram liberadas toxinas pela hidrólise ácida da casca de arroz prejudicaram o crescimento da *B. megaterium*. Contudo houve acúmulo de biomassa em um dos cultivos no qual utilizou-se um tempo de esterilização menor (mesmo contaminado) e após a extração evidenciou-se a produção de P(3HB), não descartando a hipótese da utilização do HCA como uma fonte de carbono promissora na produção deste biopolímero.

Palavras-chave: Biopolímero; P(3HB); Biotransformação; *Bacillus megaterium*; resíduos industriais.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Grânulos de PHB produzido pela <i>Wautersia eutropha</i>	19
Figura 2 –	Fórmula química geral dos PHAs.....	20
Figura 3 –	Fluxograma do processo produção do PHB.....	22
Figura 4 –	Curva típica de crescimento de microrganismos.....	26
Figura 5 –	Produção do biodiesel a partir da reação de transesterificação.....	27
Figura 6 –	Espectro FTIR do P(3HB) e P(3HB-co-3HV)	31
Figura 7 –	Curvas de DSC do P(3HB) e P(3HB-co-3HV).....	33
Figura 8 –	Fluxograma das etapas desenvolvidas experimentalmente.....	34
Figura 9 –	<i>Bacillus megaterium</i> , cepa DSMZ 32	35
Figura 10 –	Cinética de crescimento, em g.L^{-1} , das concentrações de biomassa, consumo de substrato e DO em função do tempo.....	44
Figura 11 –	Extração realizada com clorofórmio.....	48
Figura 12 –	Processo de extração de P(3HB) por hipoclorito de sódio.....	49
Figura 13 –	Resultados das extrações realizadas com clorofórmio, mistura e hipoclorito de sódio.....	49
Figura 14 –	Filme de P(3HB) resultante da extração com hipoclorito de sódio.....	49
Figura 15 –	Filme de P(3HB) resultante da extração com clorofórmio.....	50
Figura 16 –	Especto de FTIR do P(3HB) obtido da extração com clorofórmio de biomassa crescida utilizando como substrato o hidrolisado de casca de arroz	52
Figura 17 –	Espectos de FTIR do P(3HB) obtido da extração com clorofórmio de biomassa crescida utilizando como substrato o glicerol.....	53
Figura 18 –	Especto de FTIR do P(3HB) obtido da extração com clorofórmio de biomassa crescida utilizando como substrato a glicose.....	54

Figura 19 – Curva de DSC (segundo ciclo de aquecimento) do P(3HB) obtido da extração com clorofórmio de biomassa crescida utilizando como substrato o hidrolisado de casca de arroz 56

Figura 20 – Curva de DSC do P(3HB) (segundo ciclo de aquecimento) obtido das extrações realizadas com clorofórmio (A), hipoclorito de sódio (B), mistura (C) e de biomassa crescida utilizando como substrato glicerol residual..... 56

Figura 21 – Curva de DSC do P(3HB) (segundo ciclo de aquecimento) obtido das extrações realizadas com clorofórmio (A), hipoclorito de sódio (B), mistura (C) e de biomassa crescida utilizando como substrato a glicose..... 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1–	Comparação entre as propriedades físicas e mecânicas do PHB e PP.	21
Tabela 2–	Produtores industriais de P(3HB).....	23
Tabela 3–	Métodos extrativos com os solventes utilizados no experimento.....	30
Tabela 4–	Bandas características no espectro de infravermelho para o P(3HB)..	31
Tabela 5–	Composição do meio mineral.....	36
Tabela 6–	Composição da solução de micronutrientes.....	36
Tabela 7–	Dados referentes aos cultivos utilizando como fonte de carbono a glicose.....	42
Tabela 8–	Dados referentes aos cultivos utilizando como fonte de carbono o glicerol.....	43
Tabela 9–	Rendimento de biomassa por substrato e produtividade volumétrica deste processo fermentativo em relação a maior concentração de biomassa calculo do em 72 horas.....	46
Tabela 10–	Rendimento de P(3HB).....	50
Tabela 11–	Bandas obtidas no espectro de infravermelho para o P(3HB).....	52
Tabela 12–	Dados de DSC do P(3HB) obtido nos diferentes experimentos.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

μm	Micrômetro
atm	Atmosfera
$^{\circ}\text{C}$	Escala em grau Celsius
CLAE	Cromatografia líquida de alta performance
DO	Densidade óptica
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DSMZ 32	Cepa de <i>B. megaterium</i> do instituto Leibniz - DSMZ
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
$\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	Gramas por centímetros cúbicos
$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Gramas por litro
GPa	GigaPascal
GPC	Cromatografia de permeação em gel
HB	Hidroxibutirato
HMF	Hidroximetilfurfural
kcal	Quilocalorias
L	Litro
LB	Lúria Bertani
M	Molar
min	Minuto
mOsm kg^{-1}	Osmolalidade por quilograma
MPa	MegaPascal
$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Miligrama por litro
nm	Nanômetros
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA	Polihidroxialcanoatos
PHAmcl	Polihidroxialcanoato de cadeia média
PHAscI	Polihidroxialcanoato de cadeia curta
P(3HB)	Poli(3-hidroxibutirato)
PLA	Ácido poliláctico
PP	Polipropileno

rpm	Rotações por minuto
RSU	Resíduos sólidos urbanos
T _c	Temperatura de cristalização
T _{cc}	Temperatura de cristalização a frio
T _g	Transição vítrea
T _m	Temperatura de fusão cristalina
UFC.mL ⁻¹	Unidade formadora de colônia por mililitros
UV	Ultra-violeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
3.1 Polihidroxicanoatos.....	19
3.1.1 Poli(3-hidroxi-butarato).....	21
3.1.2 Produção do P(3HB).....	22
3.1.3 Aplicações.....	23
3.2 Microrganismos produtores.....	24
3.2.1 <i>Bacillus megaterium</i>	24
3.2.2 Cultivo de células em processos fermentativos.....	25
3.3 Fontes de carbono.....	26
3.3.1 Glicerol residual.....	27
3.3.2 Hidrolisado de casca de arroz.....	28
3.4 Técnicas de extração e caracterização do P(3HB).....	28
3.4.1 Métodos químicos de extração.....	28
3.4.1.1 Agentes químicos solventes.....	29
3.4.1.2 Agentes químicos digestores.....	29
3.4.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	30
3.4.3 Análise térmica.....	32
3.4.3.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	32
4 METODOLOGIA.....	34
4.1 Microrganismos e inóculo.....	35
4.2 Fontes de carbono.....	36
4.2.1 Glicerol residual.....	37
4.2.2 Hidrolisado de casca de arroz.....	37

4.2.3 Glicose.....	37
4.3 Amostragem.....	38
4.4 Métodos analíticos.....	38
4.4.1 Determinação de biomassa.....	38
4.4.2 Determinação de consumo de substrato.....	39
4.4.3 Extração e caracterização do P(3HB).....	40
4.5 Análise matemática dos dados.....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	41
5.1 Determinação de biomassa.....	41
5.1.1 Cultivos com glicose e glicerol.....	41
5.1.2 Cultivos com hidrolisado de casca de arroz.....	46
5.2 Extração e caracterização do P(3HB).....	47
5.2.1 Extração do P(3HB).....	48
5.2.2 Caracterização do P(3HB).....	51
5.2.2.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	51
5.2.2.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	55
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	62
ANEXO A.....	69

1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional e econômico tem causado grande impacto no meio ambiente. Tal fato refere-se principalmente à disponibilidade de recursos naturais necessários para o processo de desenvolvimento e conforto da sociedade. O aumento da demanda por produtos industrializados tem por consequência o aumento na produção de resíduos sólidos urbanos (RSU). No Brasil são gerados diariamente 240 mil toneladas de RSU, sendo 51 mil toneladas de resíduos plásticos. Segundo o Ministério do Meio Ambiente, cerca de 1,5 milhão de sacolas plásticas são distribuídas por hora em todo o país. Os resíduos plásticos são em sua maioria descartados em aterros sanitários brasileiros e representam 21,2 % do total de resíduos gerados (ABRELPE, 2015).

Devido à alta demanda e com o surgimento de novas tecnologias de produção a indústria polimérica teve um crescimento acelerado, consumindo 5 % do petróleo produzido comercialmente no mundo (PIVA e WIEBECK, 2004). O emprego de polímeros na fabricação de embalagens tendo, por exemplo, rápida descartabilidade e também considerando a dificuldade de degradação tem despertado grande preocupação (PIVA e WIEBECK, 2004). A extinção destes materiais poliméricos constitui um grande desafio ambiental e as técnicas de eliminação convencionais não podem resolver problemas sérios, como: o custo elevado destes processos e o grande volume de resíduos gerados.

Com o intuito de minimizar os problemas ambientais causados pelos polímeros de origem petroquímica não renovável, atualmente é grande o interesse na pesquisa de novos materiais de origem renovável e/ou biodegradável que se tornam potenciais substitutos aos materiais convencionais comumente utilizados (LEE, 1996). O uso de biopolímeros é uma das principais alternativas para a substituição de materiais plásticos derivados do petróleo, por possuírem um ciclo de vida mais curto e também por apresentarem características semelhantes aos polímeros convencionais. São produzidos a partir de matérias-primas de fontes renováveis, como: trigo, óleo de girassol, milho, mandioca, cana-de-açúcar, batata, soja, celulose, quitina, entre outras (ABNT). Somado a isso, a decomposição desses materiais em condições específicas resulta basicamente em dióxido de carbono, água e biomassa, onde o mecanismo predominante é a ação enzimática de microrganismos (SHAH, 2008).

Diversos materiais apresentam características possíveis para serem estudados e produzidos comercialmente, como: amido, polihidroxialcanoatos (PHAs) e o ácido poliláctico (PLA) (CHEN, 2017).

Os PHAs são materiais acumulados por muitos microrganismos como fonte de carbono e energia sob condições específicas de nutrientes, permitindo que as bactérias sobrevivam em condições adversas (CHEN, 2017). Os PHAs podem ser acumulados intracelularmente por muitas das bactérias que habitam o solo. O conteúdo de PHA pode chegar a até 90 % de peso seco (RAZA *et al.*, 2018). Possuem uma diversidade estrutural de monômeros, em diferentes proporções, microestruturas e massas molares, gerando assim, uma ampla classe de biopoliésteres. Dependendo da espécie bacteriana e das condições de crescimento, podem ser obtidos homopolímeros e copolímeros, resultando em materiais com diferentes propriedades mecânicas, desde mais rígidos até materiais mais flexíveis (RAZA *et al.*, 2018).

O primeiro PHA a ser descoberto foi o poli(3-hidroxiбутirato) ou P(3HB), possuindo propriedades termoplásticas, biocompatíveis e biodegradáveis. Existe grande interesse da indústria polimérica por possuir características semelhantes à de polímeros derivados de petróleo, como o polipropileno. Dessa maneira, apresenta real possibilidade de ser aplicado em várias áreas, tais como, no ramo de embalagens, tratamento de efluentes, medicina, farmacêutica, agrícola e ou como matéria-prima para a síntese de novos produtos químicos (BABEL & STEINBÜCHEL, 2001). Contudo, atualmente é contínua a busca por novos microrganismos tanto de linhagens isoladas da natureza quanto modificadas geneticamente que sejam eficientes na produção de PHAs.

A capacidade máxima de armazenamento do P(3HB) e a taxa de produção dependem do substrato utilizado e das estratégias de síntese. Embora os biomateriais possuam vantagens frente aos polímeros fósseis, o alto custo associado ao processo fermentativo limita sua aplicação. Dentre os principais fatores que afetam o custo de produção pode-se citar a produtividade do processo, rendimentos das fontes de carbono selecionadas e processos extrativos e de purificação.

Como estratégia de aumento no rendimento e diminuição dos custos totais deste processo, a utilização de substratos alternativos vem sendo bastante estudada. Uma vez que o custo do substrato representa aproximadamente 50 % do custo total de produção, a utilização de resíduos agroindustriais tem como principal objetivo viabilizar economicamente a produção do biopolímero (KIM, 2000). O Brasil destaca-se mundialmente como um dos maiores produtores de arroz, cujo seus resíduos gerados

podem ser convertidos em produtos de alto valor agregado, como a produção do P(3HB). De maneira similar, um aumento na demanda pelo uso de biodiesel faz com que seja adequada e sustentável a promoção de reutilização do glicerol residual, também fornecendo valor agregado a este subproduto bastante disponível no país (ALBUQUERQUE *et al.*, 2018). Estes resíduos, compostos principalmente por fonte de carbonos, podem ser utilizados para a fabricação de produtos de alto valor agregado, como os biopolímeros.

Um microrganismo capaz de utilizar estes resíduos agroindustriais para produzir o P(3HB) é a *Bacillus megaterium*, que por isso torna-se objeto de estudo para possível aplicação industrial, por ser uma bactéria gram-positiva bastante adaptável a diversas condições de cultivo, resistente a altas temperaturas e que ainda não é utilizada comercialmente (FACCIN *et al.*, 2009).

Considerando todos os fatores citados se faz necessário o desenvolvimento de novos processos que possuam baixo custo e impacto ambiental reduzido para tornar a produção deste biopoliéster economicamente viável e potencializar a sua aplicabilidade. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a produção de P(3HB) por fermentação submersa da bactéria *B. megaterium* utilizando fontes alternativas de carbono que são resíduos industriais. Utilizou-se a casca de arroz e o glicerol residual e os resultados foram comparados com os obtidos utilizando a glicose, considerada uma fonte de carbono padrão.

2 OBJETIVOS

Este tópico apresenta o objetivo geral do presente trabalho, subdividido em objetivos específicos.

2.1 Objetivo geral

O devido trabalho baseia-se em produzir P(3HB) por fermentação submersa da bactéria *B. megaterium*, utilizando como substrato diferentes tipos de fonte de carbono, que são considerados resíduos agroindustriais, como o hidrolisado de casca de arroz e glicerol residual. Extraí-lo e quantificá-lo, sendo os seus resultados estudados e comparados aos resultados obtidos em meio mineral suplementado com glicose como fonte de carbono padrão.

2.2 Objetivos específicos

- a) Testar o inóculo de *B. megaterium* e avaliar o seu crescimento, utilizando diferentes substratos (glicerol residual e hidrolisado de casca de arroz) como suplementação do meio mineral;
- b) Produção do P(3HB) a partir destes substratos;
- c) Separação da biomassa e extração do P(3HB) contido intracelularmente;
- d) Caracterização estrutural e térmica do P(3HB).

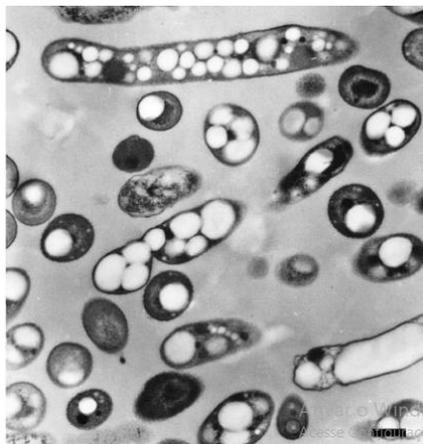
3 REFERENCIAL TEÓRICO

Nesta seção será apresentada a base teórica pesquisada para o desenvolvimento do presente trabalho. Os tópicos principais abordam os temas: Polihidroxialcanoatos, microrganismos produtores de P(3HB), fontes de carbono e técnicas para caracterização de biopolímeros.

3.1 Polihidroxialcanoatos

Os PHAs são poliésteres naturais produzidos intracelularmente por bactérias, ou seja, este processo de polimerização é dependente da presença de uma enzima conhecida como PHA sintase, o produto desta enzima é acumulado no citoplasma da célula sob a forma de grânulos com um diâmetro de aproximadamente 0.2 a 0.5 μm (Figura 1), atingindo cerca de 90 % de sua massa em base seca e sendo armazenado como reserva de carbono e energia. Possuem uma diversidade estrutural de monômeros em diferentes proporções, microestruturas e massas molares, gerando assim uma extensa classe de biopoliésteres (SIEW *et al.*, 2007).

Figura 1 – Grânulos de PHB produzido pela bactéria *Wautersia eutropha*



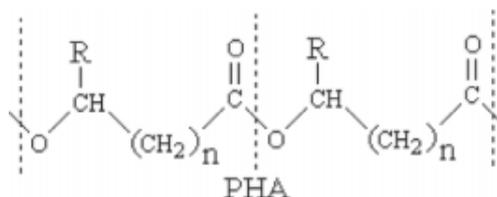
Fonte: Tian *et al.*, 2005;

As bactérias biossintetizadoras destes biopolímeros são incapazes de produzir exoenzimas suficientes, por este motivo dependem de açúcares simples, como fonte de carbono e pequenos compostos de nitrogênio orgânico (BABEL & STEINBÜCHEL, 2001). Portanto, no geral, esse polímero é sintetizado por bactérias quando há uma

limitação de um nutriente essencial, todavia devem ser expostas a um excesso de fonte de carbono (CHODAK *et al.*, 2008).

A fórmula química geral dos PHAs está representada na Figura 2. Mais de 100 monômeros distintos foram identificados em diversas bactérias, ou seja, dependendo do substrato utilizado para a produção do PHA e do metabolismo do microrganismo são produzidos diferentes monômeros e, portanto, co-polímeros, podem ser obtidos, influenciando diretamente nas variações em suas propriedades poliméricas que vão de plásticos rígidos e cristalinos a plásticos mais flexíveis com boa resistência a impacto (CATONI, 2011).

Figura 2 – Fórmula química geral dos PHAs.



Fonte: Silva *et al.*, 2007.

Os polihidroxicanoatos apresentam características semelhantes às dos polímeros convencionais, tornam-se uma potencial alternativa para substituição do polietileno e o polipropileno. Além disso, são totalmente degradados, sendo liberados na natureza em forma de água e dióxido de carbono sob condições aeróbias, e a metano e água sob condições anaeróbias (REDDY *et al.*, 2003). A degradação ocorre pela ação das enzimas despolimerases, inúmeros microrganismos excretam estas enzimas, as quais hidrolisam o PHA em oligômeros solúveis em água e monômeros, que podem ser utilizados como suplemento nutritivo celular (SCHMIDT, 2011).

Podem ser classificados em dois grupos, dependendo do número de átomos de carbono que constituem a cadeia lateral. Os monômeros constituintes do PHA são classificados em: (i) cadeia curta, quando o grupo R for igual a H, CH₃, CH₂CH₃, para n=1 (PHA_{scl} - “*short chain length*”), contendo de 3 a 5 átomos de carbono na cadeia principal e (ii) cadeia média, quando o R for igual a (CH₂)₂CH₃ a (CH₂)₈CH₃ (PHA_{mcl} - “*medium chain length*”), contendo de 6 a 16 átomos de carbono na cadeia principal (SOLAMAIN, 2013).

3.1.1 Poli(3-hidroxi-butirato)

O principal polímero da família dos PHAs e o primeiro a ser descoberto e estudado é o poli(3-hidroxi-butirato) ou P(3HB). O P(3HB) é um PHA de cadeia curta, contendo um radical metil (-CH₃) em sua cadeia. Este homopolímero é linear, totalmente isotático obtido através de fontes renováveis e composto apenas por monômeros do ácido 3-hidroxi-butirato. É bastante utilizado por ser biocompatível, biodegradável, apresentar um alto grau de polimerização e ser atóxico (SCHMIDT, 2011).

O P(3HB) possui propriedades físicas e mecânicas semelhantes à do polipropileno (PP). É um material rígido e quebradiço caracterizado pela baixa deformação, características que tornam a sua aplicação limitada na área de embalagens flexíveis. Não é solúvel em água e pouco permeável a O₂, H₂O e CO₂, é resistente a solventes orgânicos e apresenta elevada temperatura de fusão. Os átomos de carbono estão dispostos assimetricamente possuindo configuração D(-) por este motivo ele é capaz de cristalizar com cristalinidade na faixa de 55-80 % (MACHADO *et al.*, 2010).

A Tabela 1 apresenta algumas propriedades físicas e mecânicas do PHB em relação ao PP (CHODAK, 2008).

Tabela 1 – Comparação entre as propriedades físicas e mecânicas do PHB e PP.

Propriedades físicas	PHB	PP
Temperatura de fusão (°C)	175	176
Temperatura de transição vítrea (°C)	5	-10
Grau de cristalinidade (%)	55-80	50
Densidade (g/cm ³)	1,25	0,91
Módulo de Elasticidade (GPa)	3,5	1,5
Tensão máxima (MPa)	40	38
Deformação específica (%)	5	400

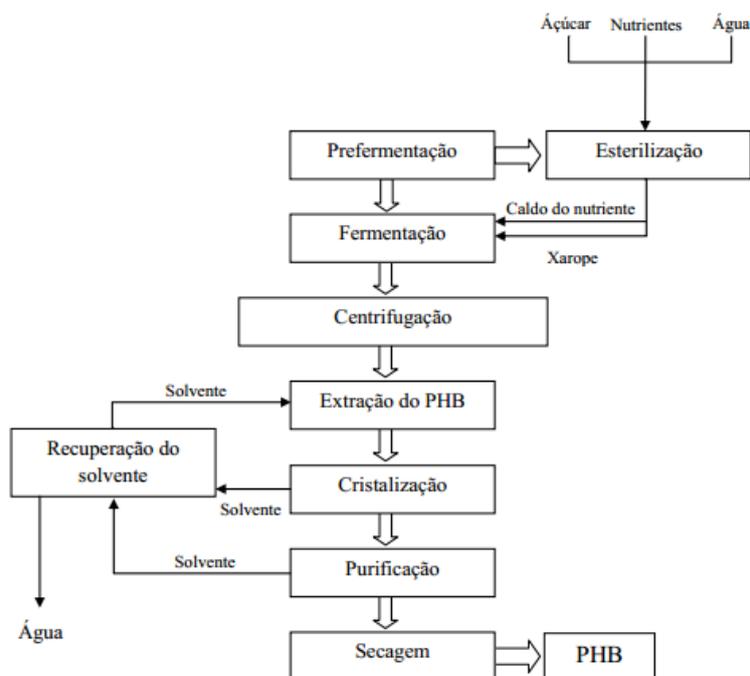
Fonte: Adaptado de Chodak (2008) e Machado *et al.* (2010)

Estudos consistem em desenvolver novas combinações de monômeros que melhorem as características termoplásticas deste homopolímero e ampliem a sua aplicabilidade.

3.1.2 Produção do P(3HB)

A produção de P(3HB) por microrganismos consiste na fermentação de açúcares. O processo de produção é dividido em duas etapas: (i) a etapa fermentativa, na qual o microrganismo é cultivado em reatores com o ácido butanóico e a fonte de carbono, em que ocorre a metabolização do açúcar disponível e o acúmulo do P(3HB) no citoplasma da célula; (ii) extração do polímero, o P(3HB) é removido e purificado por meio de processos convencionais como centrifugação ou filtração com solventes adequados até a obtenção do produto final sólido e seco (BRUNEL, 2008). Um esquema do processo geral está ilustrado no fluxograma abaixo (Figura 3).

Figura 3 – Fluxograma do processo produção do PHB.



Fonte: PHB Industrial, 2018.

O custo de produção para obtenção do P(3HB) ainda é relativamente alto para o setor industrial. Segundo estudos feitos sobre o levantamento do cenário econômico para cada capacidade produtiva do P(3HB) no Brasil com dois preços líquidos, o produto chegaria a custar 9,00 R\$/kg no início do ciclo de vida do produto e 4,50 R\$/kg sendo esse o preço de mercado baseado nos produtos derivados de petróleo (RAICHER, 2011). Uma alternativa para viabilizar a sua produção é o aumento da eficiência no processo produtivo fazendo com que o preço do PHA diminua gradativamente. Um

exemplo mostrado na Tabela 2, da empresa PHB Industrial S/A, que comercializava o P(3HB) no ano de 2003 a 12,5 a 15 US\$/Kg e conseguiu reduzir esse valor em 2010 para 3,1 a 3,7 US\$/Kg de polímero (POSADA *et al.*, 2011).

Tabela 2 – Produtores industriais de P(3HB)

Nome do produto	Empresa	Fonte de carbono	Valor (US\$/kg)	Produção (ton/ano)
Biomer®: [P(3HB)]	Biotechnology Co., Alemanha.	Sacarose	3,75-6,25 (2010)	100 (2010)
Biocycle®: [P(3HB)]	PHB Industrial S/A, Brasil	Cana-de-açúcar ou sacarose	12,5-15(2003) 3,12-3,75 (2010)	30-60000 (2010)
Biogreen®: [P(3HB)]	Mitsubishi GAS Química, Japão	Metanol	2,75 (2010)	10000 (2010)
Mirel™: [P(3HB)]	Metabolix, Telles, EUA	Sacarose	2,13 (2010)	50000 (2010)

Fonte: Adaptado, Posada *et al.*, 2011

De acordo com Takahashi (2012), os fatores que geralmente inviabilizam economicamente os biopolímeros de origem microbológica, são: (i) a sua produtividade; (ii) acúmulo total de PHA nas células; (iii) a tecnologia aplicada; (iv) a planta de produção; (v) o processo de extração/recuperação/purificação e as fontes de substrato e de nutrientes.

Por estes motivos, estudos para o melhoramento da sua produtividade se fazem necessários, como: a seleção de microrganismos e plantas eficientes na conversão de substratos complexos (resíduos agroindustriais, sucroalcooleiros, entre outros) em polímeros; desenvolvimento de técnicas de extração/recuperação mais eficientes e o desenvolvimento de processos que explorem o potencial dos microrganismos produtores. O meio de cultivo é o que mais contribui para os elevados valores na síntese do PHA, no qual a fonte de carbono representa aproximadamente cerca de 50 % dos custos de produção (TAKAHASHI, 2012).

3.1.3 Aplicações

Destacam-se em duas principais áreas, embalagens e em aplicações médicas como, por exemplo, na fabricação de microcápsulas e de pinos ortopédicos que são degradados pelo nosso organismo. Porém há reverses que limitam a comercialização dos

PHAs, que são: sua fragilidade, o seu custo de produção elevado comparado aos polímeros provenientes do petróleo, uma lenta taxa de cristalização e baixa estabilidade térmica. Porém, estas propriedades indesejáveis podem ser parcialmente superadas pela adição de aditivos ou pela mistura com outros polímeros. Entretanto, apresenta potencial na produção de itens de uso descartáveis como filmes plásticos e fraldas, utilidades domésticas, eletrodomésticos, agricultura e estabilização do solo (aplicação de fertilizantes), adesivos, tintas e revestimentos (BRITO *et al.*, 2011).

3.2 Microrganismos produtores

Segundo Locatelli (2012), mais de 250 espécies de microrganismos são capazes de acumular PHAs. Entre elas podemos citar *Azotobacter beijerinckii*, *Burkholderia cepacia*, *Cholorogloea fritschii*, *Rhodospirillum rubrum*, *Chromatium okenii* e *Cupriavidus necator*.

Mesmo existindo inúmeros microrganismos produtores destes poliésteres, apenas os que acumulam mais que 20 % de polímero por massa seca celular são competentes para serem utilizados industrialmente (LENZ & MARCHESSAULT, 2005). Portanto, deve-se levar em consideração o crescimento destes microrganismos em fontes de carbono de baixo custo para utilização em escala industrial e o nível de segurança do microrganismo entre outros fatores que viabilizam o processo de produção (LOCATELLI, 2012).

A redução de custo no mercado permite que os PHAs se tornem realmente competitivos na substituição aos polímeros convencionais. Apesar da existência de bactérias que são reconhecidas como potenciais produtoras destes poliésteres, o uso de novas cepas como a *B.megaterium*, capazes de utilizar resíduos industriais para o aumento da produção e alto acúmulo de PHA, diminuindo custos, assumem uma grande importância e estímulo para futuros estudos.

3.2.1 *Bacillus megaterium*

B. megaterium é uma bactéria com forma de bastonete ou haste, gram-positiva, encontrada normalmente no solo e formadora de esporos, ou seja, isso ocorre quando estão em ambientes que ameaçam a sua sobrevivência, com escassez de

nutrientes para que cresçam e se reproduzam. Por este motivo são resistentes e tem a capacidade de sobreviver em várias condições de estresse (VARY, 2007).

Com a descoberta da presença de esporos neste tipo de bactéria, De Bary originalmente a nomeou em 1884 de *B. megaterium* (do latim animal grande), devido ao seu tamanho (com 1,5 por 4 μm) cem vezes maior em relação à *Escherichia coli.*, (MOURA, 2002). Em 1925, Maurice Lemoigne um microbiologista francês, identificou o poli(3-hidroxibutirato) ou P(3HB) em *B. megaterium* como uma importante fonte de carbono e energia (LEMOIGNE; LENOEL; CROSON. 1950).

O diferencial no uso de *B. megaterium* em relação a outros microrganismos é a produção de P(3HB) sem limitações de nitrogênio (LUVIZETTO, 2007). Apresentou bom crescimento e rendimento em mais de 62 fontes de carbono diferentes, incluindo todo ciclo de ácido tricarboxílico, dez intermediários, tornando-se um organismo ideal para a indústria por mais de 50 anos (VARY *et al.*, 2007).

Esta bactéria produz um número de enzimas úteis, tais como amilases e proteases. Por ser não patogêna e não produzir endotoxinas é muito utilizada na produção de alimentos e produtos farmacêuticos. Entre seus produtos e compostos economicamente importantes, estão proteínas como a penicilina-acilase que é utilizada na síntese de novos antibióticos (VARY *et al.* 2007).

Por apresentar um bom desempenho de crescimento em diferentes fontes de carbono, pelo seu metabolismo relativamente simples e ampla aplicação no setor industrial, o *B. megaterium*, foi o microrganismo escolhido para o estudo.

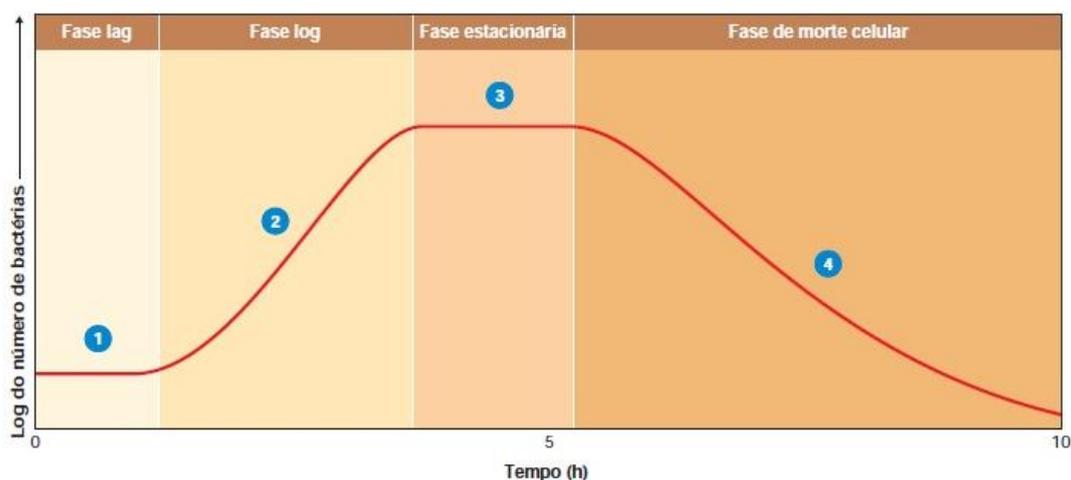
3.2.2 Cultivo de células em processos fermentativos

Considera-se o cultivo celular em batelada um sistema fechado, ou seja, que não há ocorrência de fluxos de entrada ou saída do reator, pois o volume preparado de meio líquido (composto pelos nutrientes necessários para o cultivo) é fixo. Os inóculos contendo uma porção de microrganismos pré-estabelecida são transferidos, adaptam-se ao meio nutritivo e, em seguida, crescem e se replicam gradualmente (NAJAFPOUR, 2007). Na medida em que há a multiplicação celular, os nutrientes são esgotados e produtos finais são formados. Normalmente o crescimento de microrganismos é determinado por gravimetria e densidade óptica das células (NAJAFPOUR, 2007).

A curva de crescimento dos microrganismos possui quatro fases, como mostra a Figura 4: i) na fase *lag* os microrganismos não mostram um aumento significativo de

número em determinações mássicas. É a fase de adaptação dos microrganismos ao meio; ii) A fase em que os microrganismos encontram uma quantidade superior de nutrientes disponível no meio (suprindo as suas necessidades metabólicas) é a de crescimento exponencial; iii) A diminuição da velocidade de crescimento dos microrganismos ocorre na fase estacionária ou de latência, atingindo uma fase que equipara o número de novas células com o número de morte celular. O motivo dessa fase de retardamento no crescimento pode ser devido ao choque ao meio quando não há período de aclimação, acúmulo de metabólitos tóxicos, o esgotamento de nutrientes e até mesmo de O_2 e iv) quando a quantidade de microrganismos que morre é maior a quantidade de microrganismos que se replicam denomina-se morte ou declínio celular (NAJAFPOUR, 2007; TORTORA *et al*, 2012).

Figura 4 – Curva típica de crescimento de microrganismos.



Fonte: Tortora *et al*, 2012.

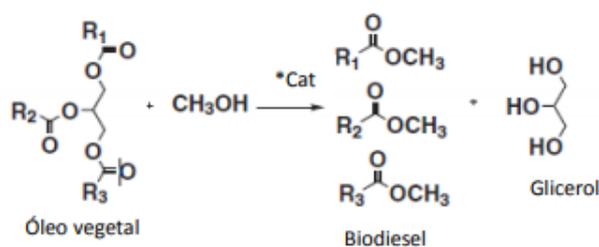
3.3 Fontes de carbono

Nesta seção serão abordadas as fontes de carbono utilizadas no presente trabalho para a produção do P(3HB).

3.3.1 Glicerol residual

O glicerol (ou 1,2,3-propanotriol) é um composto de função orgânica álcool e possui três hidroxilas em sua estrutura. O glicerol é o principal subproduto decorrente da produção de biodiesel. Durante o processo de transesterificação na produção de biodiesel são formados ésteres metílicos, ácidos graxos e glicerol (MOTA *et al.*, 2009; QUISPE *et al.*, 2013). O glicerol residual corresponde a 10 % do volume total de biodiesel produzido, ou seja, para cada três mols de ésteres metílicos é gerado um mol de glicerol (MOTA *et al.*, 2009). A reação de transesterificação pode ser observada na Figura 5.

Figura 5 – Produção do biodiesel a partir da reação de transesterificação.



*O catalisador utilizado na reação pode variar. Adaptado: Mota *et al.*, 2009.

O Brasil é o segundo maior produtor de glicerol residual de biodiesel do mundo, em 2017 produziu 4,3 milhões de m³ de biodiesel, resultando em cerca de 374,5 mil m³ de glicerol residual (ANP, 2017). A Região Sul, com uma produção de 1,8 milhão de m³, destaca-se nacionalmente como a segunda maior região produtora de biodiesel, sendo responsável por 41,1% do total nacional, 9,5% a mais que no ano de 2016 (ANP, 2017).

Apesar de ser um composto com ampla empregabilidade no setor industrial, a disponibilidade de glicerol é superior a demanda exigida, evidenciando o desequilíbrio de mercado. Contudo, novos estudos mostram que o glicerol residual contém elementos nutricionais importantes como o fósforo, magnésio, cálcio e nitrogênio, que servem como fonte nutritiva para microrganismos, podendo assim, ser uma fonte orgânica alternativa e importante em processos fermentativos (ARRUDA *et al.*, 2007). O emprego de materiais como o glicerol residual no lugar de fontes de carbono puras como a glicose se torna uma opção bastante viável, uma vez que contribui para a redução de custos do processo de fermentação para obtenção de P(3HB).

3.3.2 Casca de arroz

A produção mundial de arroz (*Oryza sativa*) é de aproximadamente 606 milhões de toneladas por ano. O Brasil destaca-se entre os dez maiores produtores, participando desta soma com 13.140.900 toneladas por ano, aproximadamente 2,17 % da produção mundial. Entre as unidades federativas, o Rio Grande do Sul é o maior produtor de arroz em casca, contribuindo com 8.474.392 toneladas, conforme datado no relatório anual de safra (IRGA, 2018).

Segundo Folleto *et al.* (2005), a casca do arroz é o subproduto de maior quantidade no processo de beneficiamento deste cereal, representando cerca de 20 % da massa do arroz em casca e contabilizando no mundo cerca de 80 milhões de toneladas por ano. A casca de arroz é constituída por celulose, lignina e resíduos inorgânicos. Nos resíduos estão contidos em média de 95 a 98 % em peso de sílica, ou seja, aproximadamente 13 a 29 % do total deste material (POUEY, 2006).

Estudos têm sido feitos com o intuito de viabilizar a utilização da casca de arroz, como por exemplo, sua utilização para substituir a madeira na produção energética, sendo esta considerada uma boa alternativa devido ao seu elevado poder calorífico de 3384 kcal/kg (COELHO *et al.*, 2002).

A casca de arroz é considerada um resíduo abundante no território nacional, mas mesmo com seu baixo custo e disponibilidade, ainda apresenta pouca aplicabilidade no setor industrial. Além disso, não há relatos de estudos que utilizam esta matéria-prima como substrato na produção fermentativa com *B. megaterium*. Neste contexto, no presente trabalho a casca de arroz na sua forma hidrolisada foi utilizada como fonte de carbono para a produção do P(3HB).

3.4 Técnicas de extração e caracterização de polímeros

Neste tópico serão abordadas as técnicas de extração e caracterização de polímeros realizadas no presente trabalho.

3.4.1 Métodos químicos de extração

Existem inúmeras técnicas para a extração intracelular de PHAs. Os métodos de extração com agentes químicos podem ser divididos em dois grandes grupos: extração com agentes químicos solventes e agentes químicos digestores.

3.4.1.1 Agentes químicos solventes

Segundo Ramsay *et al.*, (2006), a extração dos PHA_{sol} geralmente é realizada por solventes, sendo que a utilização de hidrocarbonetos halogenados como o clorofórmio, é uma das técnicas mais comuns. Contudo, o PHA_{mcl} é solúvel em diversos solventes, tornando a extração uma técnica economicamente viável e menos tóxica.

A extração por solventes orgânicos é a mais utilizada, além da simplicidade do método, gera polímeros com elevado grau de pureza e diminuta redução de massa molar (KUNASUNDARI *et al.*, 2011).

Denomina-se solvente a substância capaz de dissolver o soluto formando uma solução do soluto no solvente (MANTELLATO *et al.*, 2008). Neste caso a solubilização de polímeros por solventes ocorrerá quando as interações entre o solvente e o polímero forem maiores que a interação entre o polímero-polímero (GALEGO *et al.*, 2000).

O solvente altera a permeabilidade da membrana celular, onde em um primeiro estágio o polímero sólido em contato com o solvente tende a inchar, por meio da difusão das moléculas do solvente para dentro da massa polimérica, formando um gel inchado. No segundo estágio ocorre a desintegração do gel, onde uma solução verdadeira do polímero é formada, caracterizando a real solubilização. Quando solubilizado é separado da matéria orgânica e obtido após a evaporação do solvente (CANEVAROLO, 2002).

Os solventes mais utilizados para a obtenção do P(3HB) são: clorofórmio, acetona, metil isobutil cetona, cloreto de metileno, carbonato de propileno, acetato de etila e álcool isoamílico (MANTELLATO *et al.*, 2008; IBRAHIM *et al.*, 2009).

3.4.1.2 Agentes químicos digestores

São chamados de agentes digestores os compostos que solubilizam o material não PHA, ou seja, a biomassa residual. A técnica de digestão da matéria orgânica com hipoclorito de sódio foi desenvolvida por Willianson e Wilkinson, em 1958 (WEATHERBURN, 1967). De acordo com esse método, três fases se formam: a primeira fase é composta por clorofórmio e P(3HB), a segunda fase é de matéria orgânica residual (material não P(3HB)) e a terceira fase é composta apenas pelo hipoclorito de sódio. A recuperação do polímero é feita por precipitação em solvente e

filtração. Após estes procedimentos observa-se que a degradação do biopolímero pode ser reduzida.

De acordo com Hahn *et al.* (1995) utilizando o hipoclorito de sódio em diferentes concentrações e uma mistura de proporção 1:1 contendo clorofórmio e hipoclorito de sódio, obteve-se uma massa molar média (\bar{M}) de 770 kDa para a mistura e somente com o hipoclorito com uma concentração de 12 % obteve-se uma \bar{M} de 350 kDa.

Tabela 3 – Métodos extrativos com os solventes utilizados no experimento

Método	Pureza	Tempo de Extração	Custo	Escala industrial	Rendimento	Impacto na Massa Molar
Clorofórmio	alto	médio	Alto	não	Alto	Baixo
Hipoclorito:Clorofórmio	alto	médio	médio/alto	não	Alto	Baixo
Hipoclorito	médio/alto	médio	Médio	não	médio/alto	médio/alto

Fonte: Posada *et al.*, 2011; Mantellato *et al.*, 2008.

3.4.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia é o estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria, especificando a medida da intensidade de absorção e emissão de radiação eletromagnética, sendo uma importante ferramenta para conhecermos os níveis de energia de átomos ou moléculas (MARIN, 2013). Esses níveis de energia podem ser evidenciados pelas suas transições vibracionais onde diferentes porções do espectro de radiação eletromagnética são absorvidos em diferentes graus dependendo da estrutura molecular da amostra. As medidas de absorção podem ser interpretadas em termos de estrutura molecular (GARCIA, 2006).

O espectro no infravermelho é obtido pela passagem da radiação infravermelho através de uma amostra de substância. Os sinais obtidos são chamados de bandas de absorção e podem ser vistas em números de ondas de 4000 a 600 cm^{-1} , que correspondem às vibrações de deformações das moléculas orgânicas. A interpretação deste espectro permite verificar a presença dos grupos funcionais presentes nas moléculas. Um dos métodos mais utilizados é o espectro de absorção no infravermelho por Transformada de Fourier devido a rapidez com que é feita a análise. A sensibilidade

desta técnica é muito melhor pois todas as frequências são medidas simultaneamente. Este método pode ser aplicado em análises qualitativas e quantitativas de sólidos, líquidos ou gases. Existem algumas vantagens no uso desse método, como: a utilização de quantidades mínimas de analito por amostragem e em alguns casos a amostra não é destruída no ensaio podendo ser recuperada após a medida do espectro (CATONI, 2011).

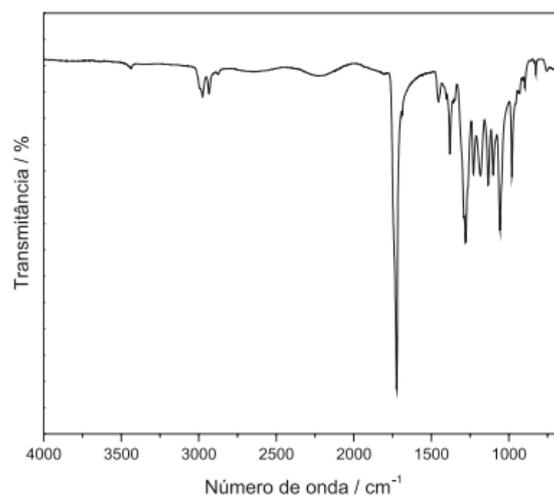
A técnica capta tanto deformações axiais quanto angulares das moléculas, contudo, como mais energia é envolvida nas deformações axiais estas são as mais utilizadas para a determinação dos tipos de ligações presentes na molécula. (CATONI, 2011). Na Tabela 4 estão descritas as bandas de absorção características para o P(3HB) no infravermelho e na Figura 6 é apresentado o espectro desse polímero.

Tabela 4 – Bandas características no espectro de infravermelho para o P(3HB).

Atribuição das bandas	P(3HB) (cm^{-1})
Deformação axial da ligação C = O	1735 – 1721
Deformação axial da ligação C – C	978
Estiramento da ligação C – H	2972 – 2850
Estiramento assimétrico e simétrico do grupo C – O – C	1272 e 1058
Deformação angular simétrica no plano dos grupos CH_3	1380

Fonte: Barud *et al.* (2011)

Figura 6 – Espectro FTIR do PHB.



Fonte: Paula *et al.*, 2013

3.4.3 Análises térmicas

Trata-se de um conjunto de técnicas que permite a medição de uma propriedade física de uma substância em função da temperatura. Dentre as técnicas, um método bastante utilizado para na caracterização do P(3HB) é a calorimetria exploratória diferencial (DSC) que mede a diferença de energia necessária à substância e à um material de referência, enquanto ambos são submetidos a uma variação controlada de temperatura. Através do DSC é possível ver eventos térmicos que podem ser basicamente transições de primeira e de segunda ordem. Exemplos de eventos observados são a temperatura de transição vítrea (T_g), a temperatura de fusão cristalina (T_m), a temperatura de cristalização (T_c), oxidação, cinética de reação e estabilidade térmica.

3.4.3.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Através da técnica de DSC (do inglês *Differential Scanning Calorimetry*) é possível determinar transições de primeira ordem que apresentam variações de entalpia – endotérmica ou exotérmica – e dão origem à formação de picos, bem como as transições de segunda ordem, que são caracterizadas pela variação na capacidade calorífica do material e causam apenas um deslocamento na linha de base (GARCIA, 2006). Neste método a amostra e uma referência (geralmente o cadinho vazio) são submetidas à um programa de aquecimento controlado e a diferença de temperatura entre ambas é monitorada em função da temperatura ou do tempo (GARCIA, 2006).

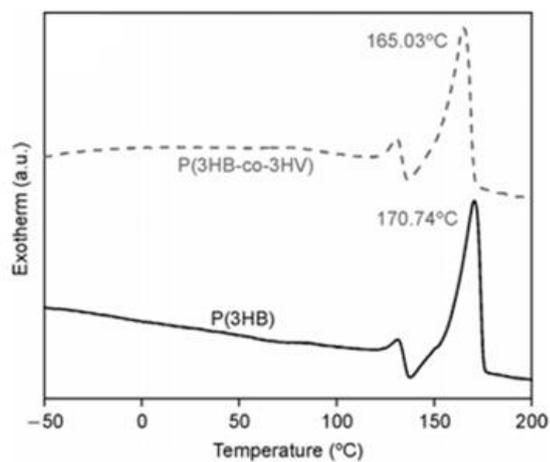
Para os polímeros, os principais eventos analisados são: a temperatura de transição vítrea (T_g), a temperatura de fusão cristalina (T_m) e a temperatura de cristalização (T_c). A técnica também é utilizada no estudo de blendas e permite avaliar a influência de aditivos nas propriedades dos polímeros (CATONI, 2011).

O PHB possui uma T_g de aproximadamente 5 °C e T_m , de 175 °C, ou seja, precisa ser processado acima de 180 °C. Esses biopolímeros possuem uma densidade na fase cristalina de 1.230 g.cm⁻³ e na fase amorfa de 1.177 g.cm⁻³ (MACHADO *et al.*, 2010). A T_g é associada à região amorfa do polímero representando a temperatura na qual se restringe a mobilidade das cadeias poliméricas pelas coesões intermoleculares.

Quando a temperatura está acima da T_g , as cadeias poliméricas adquirem mobilidade para iniciar a cristalização. Abaixo da T_g , o polímero não obtém energia

suficiente para permitir o deslocamento de uma cadeia em relação à outra e o material torna-se rígido. Logo, polímeros elastoméricos geralmente possuem a T_g abaixo da temperatura ambiente (CANEVAROLO, 2002; SOUZA *et al.*, 2004). A Figura 7, ilustra as curvas de DSC de P(3HB) e do co-polímero P(3HB-co-3HV) extraídos da bactéria *B. cereus*.

Figura 7 – Curvas de DSC de P(3HB) e P(3HB-co-3HV).

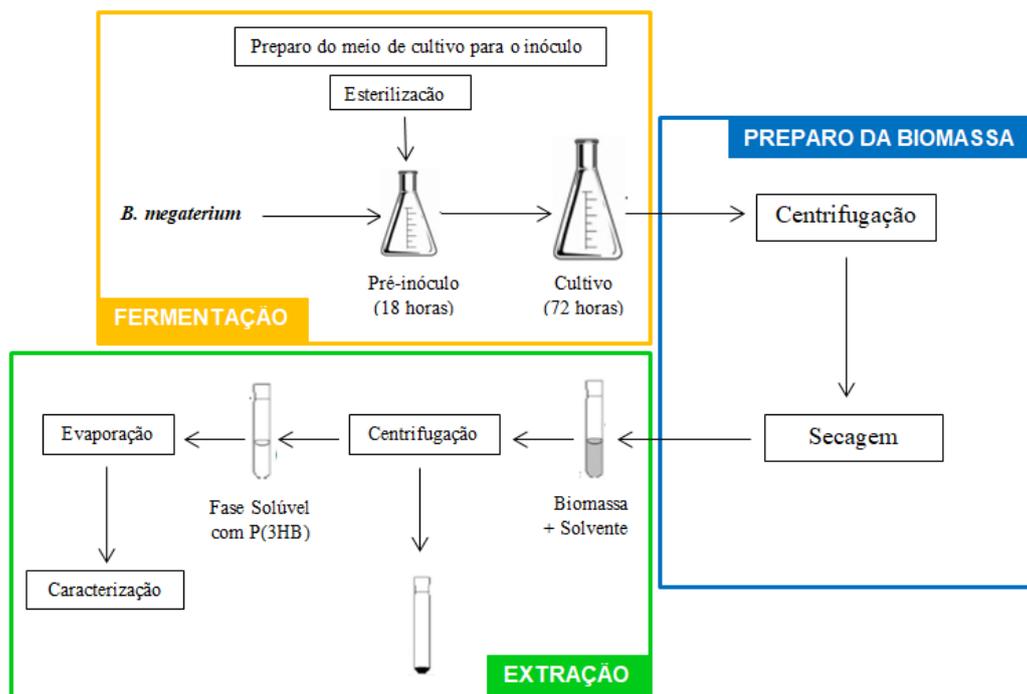


Fonte: Rituparna Das *et al.* 2018.

4 METODOLOGIA

O cultivo e biossíntese do P(3HB) foram realizados no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS) na unidade em Novo Hamburgo e no Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS). As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório Bioteclab do ICTA/UFRGS. As técnicas de FTIR e DSC foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Análises Térmicas do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (LAMAT/UFRGS). Avaliou-se a produção de P(3HB) pela bactéria *B. megaterium* em hidrolisado de casca de arroz, glicerol residual e meio mineral suplementado com glicose. Os ensaios foram feitos em estufa rotatória e realizados em triplicata. A Figura 8, apresenta o fluxograma geral do procedimento experimental.

Figura 8 – Fluxograma das etapas desenvolvidas experimentalmente



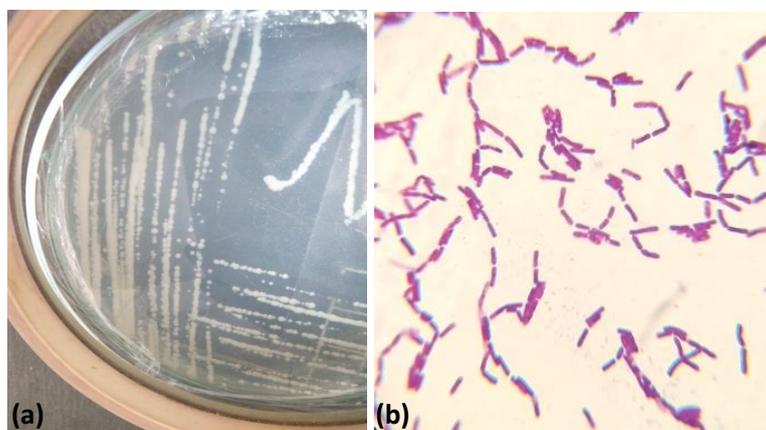
Fonte: Autora, 2019.

4.1 Microrganismo e inóculo

Foi utilizada neste trabalho a bactéria *B. megaterium* DSMZ 32 (Figura 9). As cepas foram cedidas pelo Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub integrante do Instituto

de Ciências e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS).

Figura 9 – *B. megaterium*, cepa DSMZ 32: (a) cultivo ou manutenção das células em placa e (b) microscopia do teste de Gram realizado antes das fermentações.



Fonte: Autora, 2019

A reativação de seu cultivo foi feita em erlenmeyer de 100 mL em incubadora *shaker* refrigerada com agitação orbital (Solab, modelo SL-223) a 180 rpm e 30 °C utilizando o meio de cultivo líquido Lúria Bertani (LB) composto por extrato de levedura (20 g.L⁻¹), triptona (10 g.L⁻¹) e cloreto de sódio (10 g.L⁻¹), suplementado de 20 g.L⁻¹ de glicose e 2 g.L⁻¹ de sulfato de amônia. O cultivo do pré-inóculo foi realizado durante 18 horas, sendo este o tempo necessário para que a concentração celular atinja a densidade ótica (DO) de 1,000 lida em comprimento de onda de 600 nm.

A concentração celular, dada pela densidade ótica dos cultivos líquidos, foi medida em espectrofotômetro UV-Visível (Perkin Elmer modelo Lambda 265), utilizando água destilada como branco. Foi feita a diluição das células cultivadas com solução salina estéril até aproximadamente 0,100 de absorbância.

Após este período, 10 % em volume do pré-inóculo foram transferidos para os frascos erlenmeyers de 250 mL contendo os meios de cultivo (ou seja, 10 mL de inóculo para 90 mL de meio de cultivo) a serem estudados e suplementados com o meio de cultivo mineral proposto por Wang e Lee (1997) apud Faccin 2009, detalhado nas tabelas 5 e 6 abaixo sendo o pH do meio ajustado a 7,0 com hidróxido de sódio.

Tabela 5 – Composição do meio mineral.

Componente	Concentração
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,008 g.L ⁻¹
Na ₂ HPO ₄	3,6 g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g.L ⁻¹
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g.L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01 g.L ⁻¹
Ácido cítrico	0,1 g.L ⁻¹
Solução de micronutrientes	1 mL.L ⁻¹

Fonte: Wang e Lee, 1997 apud Faccin, 2009.

Tabela 6 – Composição da solução de micronutrientes.

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

Fonte: Wang e Lee, 1997 apud Faccin, 2009.

As fontes de carbono utilizadas como substrato foram o hidrolisado de casca de arroz, glicerol residual e a glicose (como meio padrão). O meio de cultivo da bactéria *B. megaterium* foi baseado no trabalho de Faccin *et al.* (2009), onde o acúmulo de biopolímero obtido foi de 70 % em relação a biomassa seca.

4.2 Fontes de Carbono

As fontes de carbono utilizadas como substrato para a realização deste trabalho foram cedidas pelo Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS). O glicerol residual e o HCA cedidos são resíduos gerados de pesquisas realizadas no instituto.

4.2.1 Glicerol residual

Utilizou-se uma quantia de 65 g.L⁻¹ de glicerol residual como fonte de carbono para suplementação do meio mineral (tabelas 5 e 6) e 2 g.L⁻¹ de sulfato de amônia como

fonte de nitrogênio. Para ser utilizado no cultivo foi autoclavado durante 15 min a 1,0 atm para evitar qualquer tipo de contaminação externa (ROSSI *et al.*, 2012). Foram realizadas três bateladas utilizando o glicerol residual como fonte de carbono.

4.2.2 Hidrolisado da casca de arroz

Para tornar possível a utilização desta fonte de carbono pelo *B. megaterium*, foi necessário a realização de um processo de hidrólise para a quebra do amido em glicose. A hidrólise foi baseada no estudo realizado por Hickert (2014). A preparação do hidrolisado de casca de arroz foi feita em erlenmeyer, onde foram adicionados 100 g de cascas de arroz e 1 L de solução 1 % (volume) de ácido sulfúrico. Após ser submetido a tratamento em autoclave, o hidrolisado foi resfriado em banho de gelo e filtrado. Assim é obtida a porção líquida (hidrolisado ácido) que foi concentrada duas vezes em rotaevaporador a 70 °C e o seu pH ajustado a 7,0 com hidróxido de sódio.

Em seguida, o hidrolisado de casca de arroz foi centrifugado e suplementado de meio mineral (tabelas 5 e 6) e 2 g.L⁻¹ de sulfato de amônia como fonte de nitrogênio. Para ser utilizado no cultivo o meio foi autoclavado durante 30 min a 0,5 atm e a 60 min a 0,5 atm para prevenir contaminação externa e formação de substâncias tóxicas que possam inviabilizar o cultivo. Foram realizadas três bateladas utilizando o hidrolisado de casca de arroz como fonte de carbono.

4.2.3 Glicose

O meio para o ensaio padrão foi realizado contendo 20 g.L⁻¹ de Dextrose anidra P. A (marca Dinâmica, lote 90806), considerada uma fonte de carbono pura e simples de ser metabolizada pela bactéria, e suplementado com meio mineral (Tabelas 5 e 6) e 2 g.L⁻¹ de sulfato de amônia como fonte de nitrogênio. Para ser utilizado no cultivo o meio foi autoclavado durante 15 min a 1,0 atm. Foram realizadas três bateladas utilizando a glicose como fonte de carbono.

4.3 Amostragem

Os ensaios foram realizados em frascos de erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo (constituído de 10 % do inóculo deste volume), em

incubadora *shaker* refrigerada com agitação orbital (Solab modelo SL-223) a 180 rpm e 30 °C. Para as amostras contendo como fonte de carbono glicose e glicerol residual, foram retiradas amostras no início (hora zero) de introdução do inóculo, em capela de fluxo laminar nos intervalos de tempo de 12, 24, 48, 60 e 72 horas uma alíquota foi coletada até que se verificasse por meio das medidas de densidade ótica o início da fase estacionária. Foi retirado 5 mL em triplicata de cada amostragem para a realização das análises de crescimento microbiano e consumo do substrato (espectroscopia, gravimetria e HPLC).

Ao corrigir o pH do hidrolisado ácido da casca de arroz, a tonalidade do líquido que era marrom claro passa a ser marrom escuro e devido a este fato foi inviável a utilização da leitura em espectrofotômetro. Portanto, para as amostras contendo como fonte de carbono o hidrolisado de casca de arroz, foi necessário a reprodução da técnica de diluição seriada até a diluição 10^{-4} onde as alíquotas foram plaqueadas em duplicata, utilizando o meio LB sólido. Então, as amostras foram retiradas no início (hora zero) de introdução do inóculo, em fluxo laminar nos intervalos de tempo de 12, 24, 48, 60 e 72 horas uma alíquota foi coletada até que se verificasse por meio de UFC/mL o crescimento bacteriano. Retirou-se 5 mL de cada amostragem para a realização das análises de crescimento microbiano e consumo do substrato.

4.4 Métodos analíticos

A seção seguinte apresenta os métodos analíticos empregados neste trabalho para determinação de biomassa, determinação do P(3HB), determinação dos açúcares, extração e caracterização do P(3HB).

4.4.1 Determinação de biomassa

O crescimento microbiano foi acompanhado através do método turbidimétrico a 600 nm com o espectrofotômetro UV-Visível (Perkin Elmer modelo Lambda 265) e a determinação da biomassa total foi realizada por gravimetria com estufa de secagem (SL-100) e balança analítica (Shimadzu modelo AUX220;). Esta última utilizada como método de quantificação para mensurar o crescimento microbiano durante o cultivo. As amostras contendo 3 mL foram coletadas dos cultivos e centrifugadas a 3300 rpm durante 30 minutos, com centrífuga (Novatecnica modelo NT810), lavadas e colocadas

em estufa a 75 °C até atingirem peso constante. O valor da biomassa total corresponde a massa medida menos a massa do frasco vazio considerando somente o volume coletado.

Para melhor elucidar a quantificação de biomassa o coeficiente de rendimento de biomassa relativo ao substrato (γ_{xs}) e a produtividade volumétrica deste processo fermentativo em relação a maior concentração de biomassa (Q_x) foram calculados. Segundo Doran (1995) o rendimento de biomassa de um cultivo fermentativo, define-se como a quantidade de biomassa obtida para um determinado substrato. O valor da quantidade de biomassa obtida por unidade de massa de substrato consumido para o crescimento foi calculado pelo γ_{xs} , onde X_f é a concentração final de biomassa, X_0 a concentração inicial, S_0 a concentração inicial de substrato e S_f a concentração final de substrato do processo fermentativo. Já a Q_x é uma medida que evidencia a produtividade como a velocidade média de crescimento, onde X_m é a maior concentração de biomassa seca obtida no cultivo V é o volume em litros e t_f é o tempo final da fermentação. São calculadas pelas seguintes equações:

$$\gamma_{XS} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad \text{Equação 1}$$

$$Q_X = \frac{X_m}{V \cdot t_f} \quad \text{Equação 2}$$

4.4.2 Determinação de açúcares e consumo de substrato

A caracterização das amostras do hidrolisado de casca de arroz e do glicerol residual foram feitas determinando as concentrações dos açúcares por Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAE). Após a centrifugação, o sobrenadante de cada amostra do processo de gravimetria foi coletado e conservado em freezer até a análise cromatográfica. O sobrenadante foi descongelado e diluído na proporção 1:10 com água destilada.

A solução diluída foi filtrada em membrana de acetato de celulose 0,20 μm (marca Sartorius) para remoção de biomassa e posterior análise de substrato por CLAE, em equipamento utilizado da marca Shimadzu, detector de índice de refração (RID), coluna 87 H em forno 45°C, eluente ácido sulfúrico 0,05 mol.L⁻¹ e fluxo de 0,6 mL.min⁻¹. A curva de calibração padrão foi feita com glicose (fonte de carbono padrão).

4.4.3. Extração e caracterização do P(3HB)

Para fins comparativos no processo de extração utilizou-se o clorofórmio, o hipoclorito de sódio (12 %, PROC9 indústria, Lote: 1905006) e uma mistura 1:1 contendo clorofórmio e hipoclorito de sódio. O processo foi realizado a 37°C, por uma hora utilizando um volume de 20 mL de solvente 0,2 g de biomassa seca. Posteriormente foi feita a centrifugação (3300 rpm por 30 minutos) e o polímero recuperado com solvente e seco em estufa a 40 ° C (adaptado de Hahn *et al.*), (1995). Após seco, o P(3HB) foi caracterizado por espectroscopia de absorção no infravermelho (Espectrofotômetro FTIR Nicolet 6700) no modo transmissão de 4000 a 400 cm⁻¹. Todos os espectros foram obtidos com um total de 64 varreduras. As análises de DSC foram realizadas utilizando o equipamento TA Instruments DSC modelo DSCQ2000, em atmosfera de nitrogênio com um fluxo de 50 mL min⁻¹. As amostras foram submetidas a dois ciclos de aquecimento/resfriamento com taxa de 20 °C.min⁻¹ na faixa de temperatura entre -30 a 180 °C. A T_g, T_{cc} e T_m foram obtidas a partir do segundo ciclo de aquecimento e T_c do primeiro ciclo de resfriamento.

A percentagem de P(3HB) acumulado na célula é calculada com o valor obtido em gramas de polímero de cada extração e células totais (X_r) utilizadas neste processo em gramas (FACCIN *et al.*, 2009). Conforme a equação 3:

$$\%_{P(3HB)} = \frac{P(3HB)}{X_r} \cdot 100 \quad \text{Equação 3}$$

4.5 Análise matemática de dados

Os dados experimentais foram analisados utilizando-se o software gráfico para análise de dados e estatística, OriginPro[®] 9, versão 90E, Copyright[®] 1991 - 2013 OriginLab Corporation.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados resultados obtidos nos experimentos realizados.

5.1 Determinação de biomassa

Este tópico apresenta os resultados experimentais e os dados obtidos a partir da determinação de biomassa dos cultivos, utilizando como fonte de carbono glicose, glicerol residual e hidrolisado de casca de arroz.

5.1.1 Cultivos com glicose e glicerol residual

Para base dos cálculos, as medidas necessárias para o cultivo são: Densidade Óptica (DO), concentrações de substrato e de biomassa seca. Estas medidas foram registradas nos tempos de 0, 12, 24, 48, 60 e 72 horas durante o decorrer do experimento. Estes dados experimentais estão dispostos nas Tabelas 7 e 8.

Os cultivos em bateladas foram realizados em triplicata. Nos ensaios utilizando glicose, de acordo com os dados obtidos, a concentração de substrato inicial era de aproximadamente 10,8 g.L⁻¹, 13 g.L⁻¹ e 8,5 g.L⁻¹ de glicose. Já os ensaios realizados com glicerol residual a concentração de substrato inicial era de aproximadamente 53,18 g.L⁻¹, 52,45 g.L⁻¹ e 42,74 g.L⁻¹. Embora os meios de cultivo tenham sido preparados com 20 g.L⁻¹ de glicose e 65 g.L⁻¹ de glicerol residual, as concentrações iniciais de substrato indicadas pela CLAE (ANEXO 1) não alcançaram estes valores. Isso se deve as fontes de carbono não apresentarem uma pureza elevada e também levando em consideração que possivelmente houve decomposição ou inversão do açúcar presente no meio durante o processo de esterilização.

Através dos gráficos mostrados na Figura 10, é possível verificar o acúmulo de biomassa, o crescimento celular e o consumo de substrato pelo *B. megaterium* ao longo do tempo. Os gráficos representativos dos dados de cultivo (A), (B) e (C), correspondem aos resultados obtidos nos diferentes cultivos com glicose, enquanto os gráficos (A'), (B') e (C'), correspondem aos resultados obtidos nos diferentes cultivos com glicerol residual como fonte de carbono.

Tabela 7 – Dados referentes aos cultivos utilizando como fonte de carbono a glicose.

Batelada 1				Batelada 2				Batelada 3			
DO do inóculo:		0,1061		DO do inóculo:		0,1007		DO do inóculo:		0,1007	
Tempo (h)	DO (abs)	Concentração de substrato (g.L ⁻¹)	Biomassa seca (g.L ⁻¹)	Tempo (h)	DO (abs)	Concentração de substrato (g.L ⁻¹)	Biomassa seca (g.L ⁻¹)	Tempo (h)	DO (abs)	Concentração de substrato (g.L ⁻¹)	Biomassa seca (g.L ⁻¹)
0	0,1090	10,7800	0,5778	0	0,0692	12,9533	0,9000	0	0,0696	8,5033	0,0778
12	9,2123	9,7100	2,3889	12	9,6131	8,5666	2,5222	12	9,5492	8,0166	1,8111
24	15,9011	8,8033	2,9000	24	16,5637	8,2033	3,1222	24	15,8281	6,5833	2,7333
48	17,9576	7,2433	3,8556	48	18,5877	6,5266	4,5556	48	18,5305	5,8733	2,8889
60	17,1137	6,1933	4,2500	60	16,4856	5,5966	4,0778	60	18,4151	4,3600	2,9111
72	16,0491	5,0166	4,2333	72	14,2993	2,1566	4,3000	72	14,5777	3,0800	3,1111

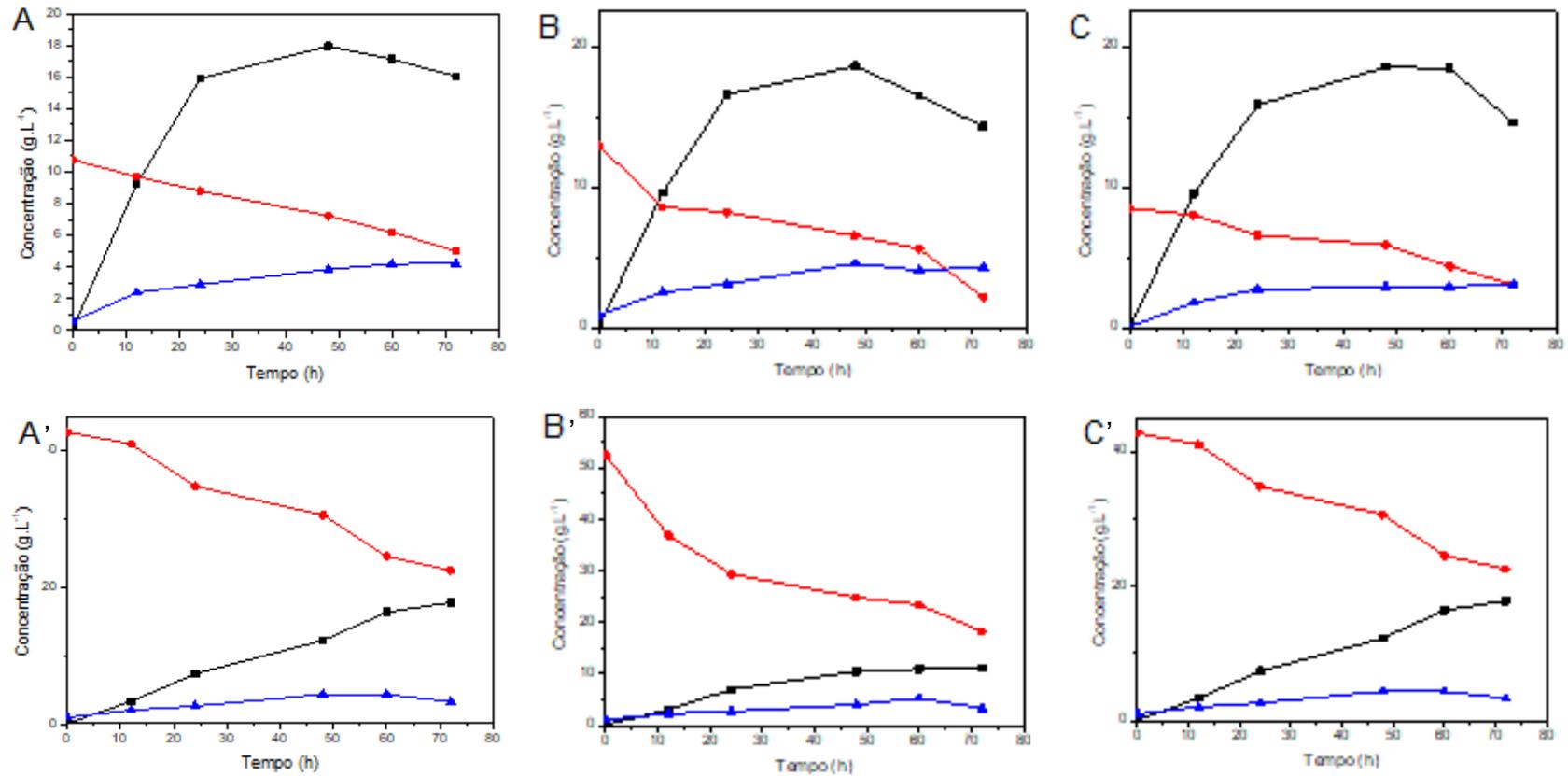
Fonte: Autora, 2019.

Tabela 8 – Dados referentes aos cultivos utilizando como fonte de carbono o glicerol residual.

Batelada 1				Batelada 2				Batelada 3			
DO do inóculo:		0, 10786		DO do inóculo:		0,10786		DO do inóculo:		0,11610	
Tempo (h)	DO (abs)	Concentração de substrato (g.L ⁻¹)	Biomassa seca (g.L ⁻¹)	Tempo (h)	DO (abs)	Concentração de substrato (g.L ⁻¹)	Biomassa seca (g.L ⁻¹)	Tempo (h)	DO (abs)	Concentração de substrato (g.L ⁻¹)	Biomassa seca (g.L ⁻¹)
0	0,0738	53,1833	0,4667	0	0,0907	52,4500	1,1556	0	0,0806	42,7400	0,9778
12	4,77	42,7100	1,8556	12	3,1431	36,8533	2,2778	12	3,3317	41,0066	2,0222
24	7,1588	36,5466	2,5222	24	6,9366	29,3766	2,7111	24	7,3372	34,8300	2,6222
48	15,7153	31,4200	4,4889	48	10,4688	24,8100	4,0444	48	12,2359	30,5866	4,3556
60	18,3256	28,0833	6,1889	60	10,9514	23,4066	5,3111	60	16,3818	24,5266	4,3111
72	17,4442	24,0600	2,6222	72	11,1977	18,2400	3,3222	72	17,7852	22,4766	3,2778

Fonte: Autora, 2019.

Figura 10 – Cinética de crescimento, em g.L^{-1} , das concentrações de biomassa (\blacktriangle), consumo de substrato (\bullet) e DO (\blacksquare) em função do tempo.



Fonte: Autora, 2019.

Pode-se observar pelas curvas de DO que a fase de crescimento para a cultura estudada teve a duração de aproximadamente 48 h utilizando glicose como fonte de carbono. Diferentemente das culturas utilizando glicerol residual que foi de 48 h no cultivo (B'), e nos cultivos (A') e (C') apresentaram um perfil crescente até 72 h. Deve-se lembrar que a leitura de DO quantifica tanto células viáveis quanto não viáveis, pela turbidez do meio. Este fato pode levar a um “falso” positivo no aumento da biomassa por este método, o que pode contribuir para esta discrepância nos resultados obtidos.

Avaliando graficamente o consumo total de substrato nos meios, é possível observar que a bactéria consumiu uma quantidade similar, cerca de 33,12 % em média para glicose e 44,2 % em média em cultivos no glicerol. Estes valores nos mostram que a *B. megaterium* possui um aparato metabólico próprio para o consumo de ambas fontes de carbono.

A maior concentração de biomassa nos meios cultivados com glicose foi de 4,25 g.L⁻¹ em 60 h de cultivo (A), 4,56 g.L⁻¹ em 48 h de cultivo (B) e 3,11 g.L⁻¹ em 72 h de cultivo (C). A concentração de biomassa total no meio cultivado com glicerol residual foi de 6,18 g.L⁻¹ em 60 h de cultivo (A'), 5,31 g.L⁻¹ em 60 h de cultivo (B') e 4,35 g.L⁻¹ em 48 h de cultivo (C'). Os dados obtidos nestes tempos condizem com os resultados analisados por MCCOOL *et al.* (1996), onde sugeriram que o crescimento celular no acúmulo do PHA foi maior que o crescimento em peso seco das células durante a fase de crescimento exponencial e estacionária.

OMAR *et al.* (2001) cultivaram *B. megaterium* com diferentes fontes de carbono, com este estudo puderam constatar que devido à falta de nitrogênio e provavelmente outros nutrientes essenciais para a manutenção celular, ocorreu a esporulação da bactéria levando ao consumo do P(3HB); e observaram também que o acúmulo de biopolímero está diretamente relacionado com o crescimento celular. Muito embora a determinação de nitrogênio nas amostras coletadas não foi realizada, seria interessante quantificar este nutriente para verificar melhor a sua influência.

Fica evidente nos cultivos suplementados com glicose que há uma diminuição da biomassa total, conforme mostrado na Tabela 7. Possivelmente há consumo de biopolímero neste período pela bactéria. A glicose é o açúcar mais facilmente metabolizado sendo válido citar que este valor diminuto de biomassa total é correspondente à quantidade de açúcar disponível no meio. Comparando os dois substratos, os cultivos utilizando glicose como fonte de carbono obtiveram maior

rendimento de biomassa, mesmo o glicerol estando em maior quantidade no meio. A Tabela 9 mostra o γ_{xs} e a Q_x dos cultivos.

Tabela 9 – Rendimento de biomassa por substrato (γ_{xs}) e produtividade volumétrica deste processo fermentativo em relação a maior concentração de biomassa (Q_x) calculado em 72 h, 60 h e 48 h.

Substrato	Batelada	γ_{xs} (g.g ⁻¹)	Q_x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) em 72 h	Q_x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) em 60 h	Q_x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) em 48 h
Glicose	A	0,6342	0,0592	0,0708	0,0885
	B	0,3150	0,0632	0,0759	0,0948
	C	0,5593	0,0432	0,0518	0,0648
Glicerol	A'	0,0616	0,0859	0,1031	0,1289
	B'	0,0630	0,0737	0,8851	0,1106
	C'	0,1135	0,0604	0,0725	0,9062

Fonte: Autora, 2019.

Levando em consideração as diferentes concentrações iniciais de substrato, os valores da Q_x são equiparentes. Supondo de maneira geral, considerando-se as mesmas fermentações, a produtividade de P(3HB) assume valores maiores no horário de menor duração (se a fermentação apresenta 0,0592 g P(3HB). L⁻¹.h⁻¹ a 72 h em 60 h de cultivo apresentaria 0,0708 g P(3HB). L⁻¹.h⁻¹ e em 48 h apresentaria 0,0885 g P(3HB) .L⁻¹.h⁻¹, por exemplo), o que leva a crer que existe uma duração ótima de fermentação na qual a produtividade de P(3HB) seja máxima. Este fator é muito importante do ponto de vista econômico para um bioprocessos.

5.1.2 Cultivos com hidrolisado de casca de arroz

Na primeira batelada não houve garantia de esterilização do meio de cultivo, observou-se uma contaminação cruzada por fungos e bactérias, o que impossibilitou o acompanhamento do crescimento celular por contagem de UFC/mL. Após completar as 72 horas de cultivo, optou-se congelar as amostras e analisá-las, visto que após a centrifugação houve acúmulo de biomassa. A partir desta verificação, o procedimento de esterilização do meio de cultivo, que antes era realizado nas condições de 120 °C, 0,5 atm por 30 min, passou a ser realizado nas mesmas condições de temperatura e pressão, porém por um período de 1 h.

Não foi possível observar o crescimento de biomassa em dois cultivos, utilizando como fonte de carbono o hidrolisado de casca de arroz, devido ao alto teor de compostos inibitórios (HMF, furfural, ácido acético). Em estudos realizados por Hickert *et al.* (2013), foi possível constatar que conforme a temperatura aumenta, maior são as concentrações destes compostos inibitórios, possivelmente o processo de esterilização acarretou uma certa toxicidade ao meio de cultivo.

O crescimento de bactérias e leveduras em um meio complexo como o hidrolisado de arroz requer um aparato metabólico avançado no microrganismo, pois além de fermentar açúcares em altos níveis de inibitórios, ainda necessita regular-se internamente para suportar valores altos de pressão osmótica. A pressão osmótica do meio de hidrolisado é de aproximadamente $1539 \text{ mOsm kg}^{-1}$ valor muito superior ao encontrado em meio similar sintético composto por glicose (316 mOsm kg^{-1}) (HICKERT *et al.*, 2013).

O hidrolisado utilizado neste trabalho foi submetido somente a hidrólise ácida, o que proporciona uma quantidade inferior de glicose (10 g.L^{-1}) no meio quando comparado com a quantidade de xilose (27 g.L^{-1}) (ANEXO A). Na hidrólise ácida, a fração hemicelulósica do meio é convertida a monômeros de glicose (em menor quantidade) e xilose e arabinose em maior quantidade. Para que a parte celulolítica da matriz lignocelulósica possa ser convertida a glicose, é necessária a hidrólise enzimática, que não foi testada neste trabalho.

Segundo Glanert (2015), a bactéria *B. megaterium* é capaz de metabolizar tanto hexoses (glicose), quanto pentoses (xilose e arabinose) em meio sintético e hidrolisado de casca de soja, porém apresenta menor crescimento em meio composto por xiloses. Este fato não foi confirmado neste trabalho ao se utilizar a casca de arroz como substrato, diferenciação que pode ocorrer devido a oferta de outros nutrientes no meio de cultivo, como fósforo, ácidos orgânicos, minerais etc. Outros estudos devem ser realizados para elucidar estas diferenças.

Segundo a FAO (2011), a casca de arroz contém 2,8 % de proteínas em sua composição, conseqüentemente o meio hidrolisado já possui proteínas que podem atuar como fonte de nitrogênio para a bactéria. Ao suplementar o meio com o sulfato de amônia (2 g.L^{-1}) houve a disponibilidade em quantidades excessivas de fonte de nitrogênio, inibindo o funcionamento metabólico da bactéria.

5.2 Extração e caracterização do P(3HB)

Este tópico apresenta os dados experimentais e resultados obtidos a partir da extração e caracterização do P(3HB). Cabe destacar que as extrações foram realizadas a partir de um agente químico solvente (clorofórmio), um agente químico digestor (hipoclorito de sódio) e uma mistura de ambos.

5.2.1 Extração

O clorofórmio alterou a permeabilidade da membrana celular e em contato com o polímero ocorreu então a difusão das moléculas do solvente no espaço livre existente entre as cadeias poliméricas, acarretando então a solubilização do polímero. Logo após a sua solubilização, o solvente contendo o P(3HB) foi separado da matéria orgânica (Figura 11) e obtido após evaporação do solvente.

Figura 11 – Extração realizada com clorofórmio



Fonte: Autora, 2019.

Já com a utilização da mistura (1:1 de hipoclorito de sódio e clorofórmio) pode-se observar três fases se formando: a primeira fase é composta por clorofórmio e P(3HB), a segunda fase é de matéria orgânica residual (material não P(3HB)) e a terceira fase é composta apenas pelo hipoclorito de sódio.

Na extração realizada com o hipoclorito de sódio ocorreu a formação de um precipitado, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se água destilada a fim de separar algum resquício de P(3HB) da biomassa e por fim extraiu-se o P(3HB) com 200 μ L de clorofórmio onde após evaporação do solvente pode-se observar a formação um biofilme (Figura 12).

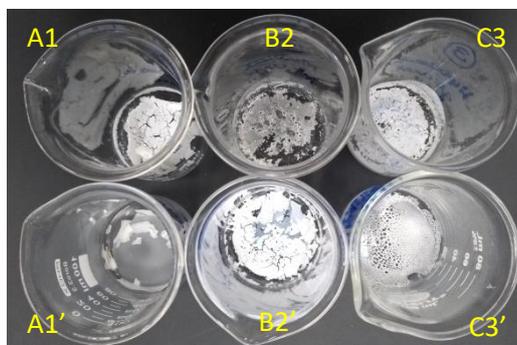
Em todas as extrações realizadas após a etapa de evaporação do solvente, o P(3HB) extraído apresentava-se em forma de um filme quebradiço depositado no fundo dos copos de béquer, onde estão dispostos da seguinte maneira: (A), (B) e (C) na Figura 13 os resultados correspondem às extrações realizadas utilizando a biomassa seca do cultivo em que foi utilizado o glicerol residual como fonte de carbono e (A'), (B') e (C') utilizando a biomassa seca correspondente ao cultivo com glicose. Alguns foram facilmente removidos como mostra a Figura 14.

Figura 12 – Processo de extração de P(3HB) por hipoclorito de sódio a 12%



Fonte: Autora, 2019.

Figura 13 – Resultados das extrações realizadas com clorofórmio (A1 e A1'), mistura (B2 e B2') e hipoclorito de sódio (C3 e C3').



Fonte: Autora, 2019.

Figura 14 – Filme de P(3HB) resultante da extração com hipoclorito de sódio



Fonte: Autora, 2019.

A análise da biomassa seca obtida no cultivo contendo o HCA como fonte de carbono foi efetiva, como mostrado na Figura 15. Uma vez que para esse cultivo observou-se a contaminação cruzada que resultou em menor produção de biopolímero e baixo acúmulo de biomassa, a extração para este experimento foi realizada somente com o clorofórmio.

Figura 15 – Filme de P(3HB) resultante da extração com clorofórmio



Fonte: Autora, 2019.

A Tabela 10 apresenta os resultados de rendimentos em percentual de P(3HB), utilizando a equação 3 para os três procedimentos empregados na extração.

Tabela 10 – Rendimentos de P(3HB)

Solvente	Susstrato	% _{P(3HB)}
Clorofórmio	Glicose	19
	Glicerol	22
	Hidrolisado	11
Clorofórmio:Hipoclorito	Glicose	27
	Glicerol	33
Hipoclorito	Glicose	52
	Glicerol	16

Fonte: Autora, 2019.

A metodologia descrita foi eficiente na obtenção do biopolímero. O rendimento obtido nas extrações com a mistura (hipoclorito de sódio e clorofórmio) e o hipoclorito de sódio foi superior em comparação aos resultados obtidos com clorofórmio, evidenciando então, que é possível diminuir a utilização desse organoclorado nos processos de extração do P(3HB).

O percentual de P(3HB) obtido nas extrações com a mistura foi de 27 % utilizando a biomassa seca do processo fermentativo com glicose e 33 % utilizando a

biomassa seca do processo fermentativo com glicerol residual. Estes resultados foram compatíveis com os resultados obtidos por Valappil *et al.* (2007), onde foi encontrado 38 % em de P(3HB) acumulado em biomassa seca. Na literatura são poucos os estudos que empregam na extração a mistura de hipoclorito de sódio com clorofórmio em bactérias gram-positivas.

Para que a extração com agentes digestores químicos seja mais efetiva, outros métodos de extração de P(3HB) devem ser testados, como por exemplo, o descrito por Prasanna *et al* (2011), onde o processo de extração a partir da *B. megaterium* MTCC453 envolveu três etapas: Na primeira adicionou-se a mistura de clorofórmio e hipoclorito de sódio à biomassa seca, seguido de filtração separando os restos celulares da solução polimérica. Na última etapa, ocorreu a precipitação do P(3HB) após adição de metanol e água. Os autores obtiveram uma recuperação de P(3HB) de 84% no final do processo.

5.2.2 Caracterização do P(3HB)

Este tópico apresenta os dados experimentais e resultados obtidos a partir da caracterização do P(3HB) utilizando a FTIR e a DSC.

5.2.2.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A partir das análises de FTIR foi possível observar que o P(3HB) foi efetivamente obtido nos experimentos realizados, uma vez que os espectros apresentaram as bandas de absorção características do polímero. Os espectros de FTIR dos polímeros sintetizados a partir das diferentes fontes de carbono são mostrados nas Figuras 16, 17 e 18. Como o esperado, todas as amostras apresentaram bandas similares. Os picos característicos para o estiramento das ligações C-H estão presentes na região em torno de 3000 cm^{-1} . A forte absorção em 1720 cm^{-1} indica a presença de carbonila de ésteres. As vibrações simétricas e assimétricas C-O-C podem ser vistas em ~ 1055 e 1270 respectivamente, onde pequenas variações no número de onda para as diferentes amostras são observados. A banda de deformação angular simétrica do radical metila ($-\text{CH}_3$) é vista em 1379 cm^{-1} . Os espectros estão de acordo aos encontrados por Pereira *et al.*, (2001) e Barud *et al.* (2011) para o P(3HB), evidenciando o sucesso do processo e das fontes alternativas de carbono na obtenção do biopolímero. A absorção na região de

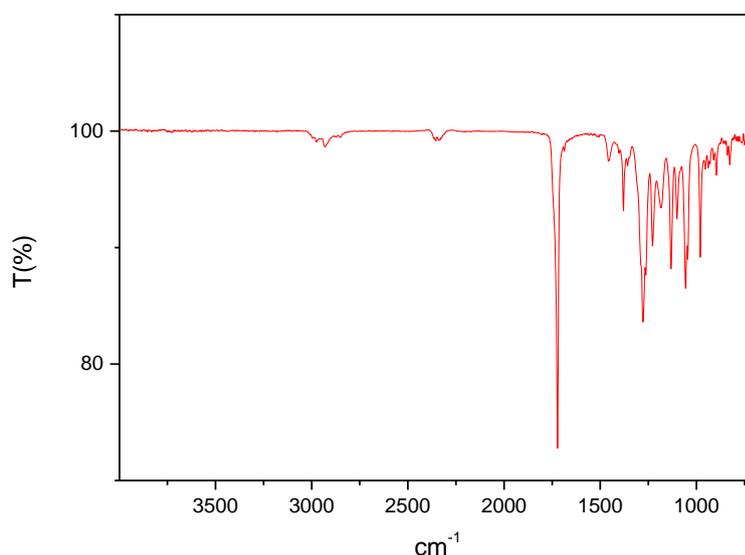
3500 cm^{-1} , proveniente do estiramento da ligação -OH foi observada com maior intensidade nas amostras extraídas com a mistura, o que pode indicar que nesse caso houve maior quebra das cadeias durante o processo e com isso, maior quantidade de hidroxila terminal está presente. Estes resultados devem ser posteriormente confirmados a partir da massa molecular dos polímeros obtidos. A Tabela 11 compila as principais bandas de absorção do P(3HB) obtido neste experimento.

Tabela 11 – Bandas de absorção (cm^{-1}) de FTIR para o P(3HB)

Solvente	Substrato	C-O-C	CH ₃	C-H	C=O
Clorofórmio	Glicose	1275 e 1055	1379	2925	1720
	Glicerol	1275 e 1055	1379	2925	1720
	Hidrolisado	1262 e 1044	1379	2925	1721
Clorofórmio:Hipoclorito	Glicose	1263 e 1055	1379	2920	1721
	Glicerol	1275 e 1055	1378	2924	1720
Hipoclorito	Glicose	1276 e 1055	1379	2933	1720
	Glicerol	1275 e 1055	1379	2925	1720

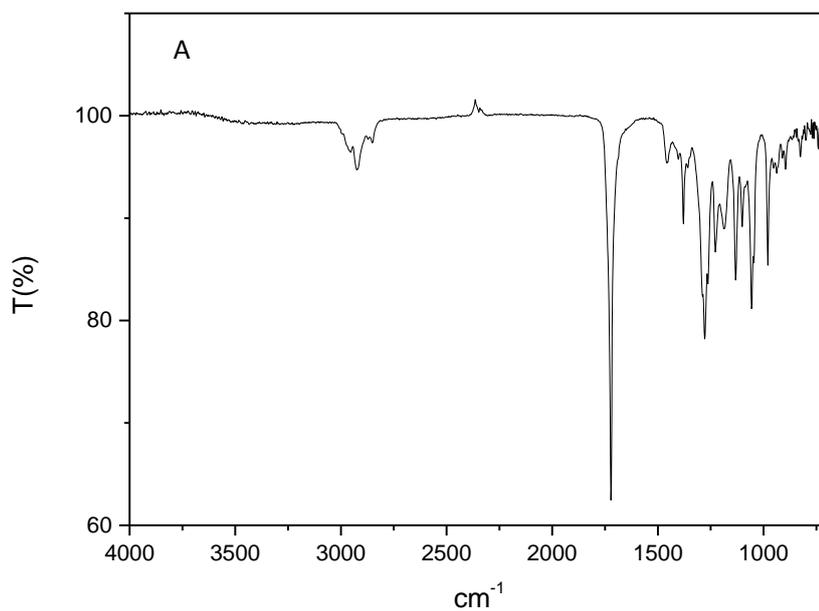
Fonte: Autora, 2019.

Figura 16 – Espectro de FTIR do P(3HB) obtido da extração com clorofórmio de biomassa crescida utilizando como substrato o hidrolisado de casca de arroz

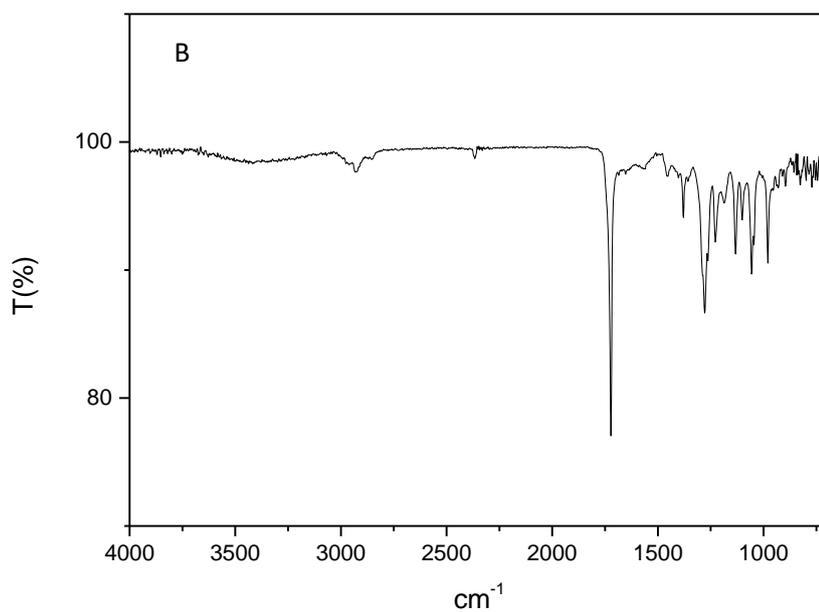


Fonte: Autora, 2019.

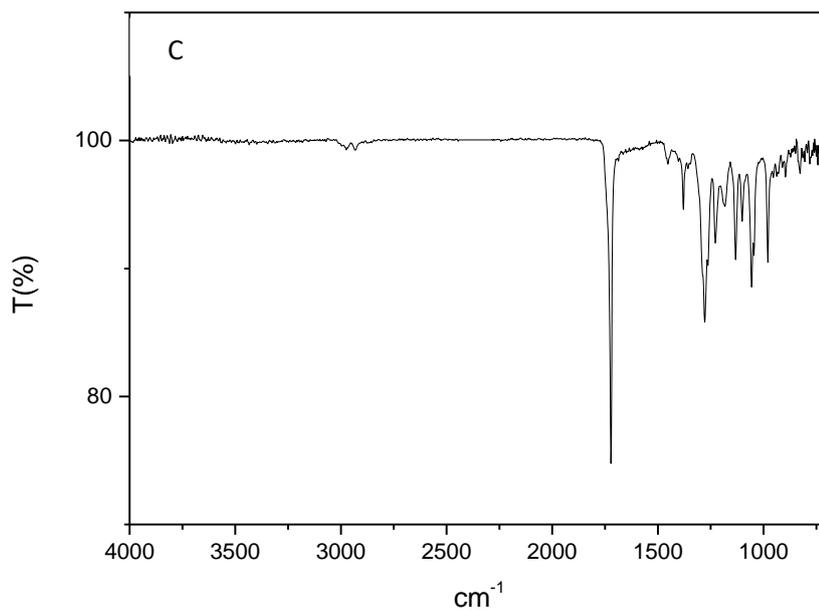
Figura 17 – Espectro de FTIR do P(3HB) obtido das extrações realizadas com clorofórmio (A), mistura (B) e hipoclorito de sódio (C) de biomassa crescida utilizando como substrato glicerol residual



Fonte: Autora, 2019.

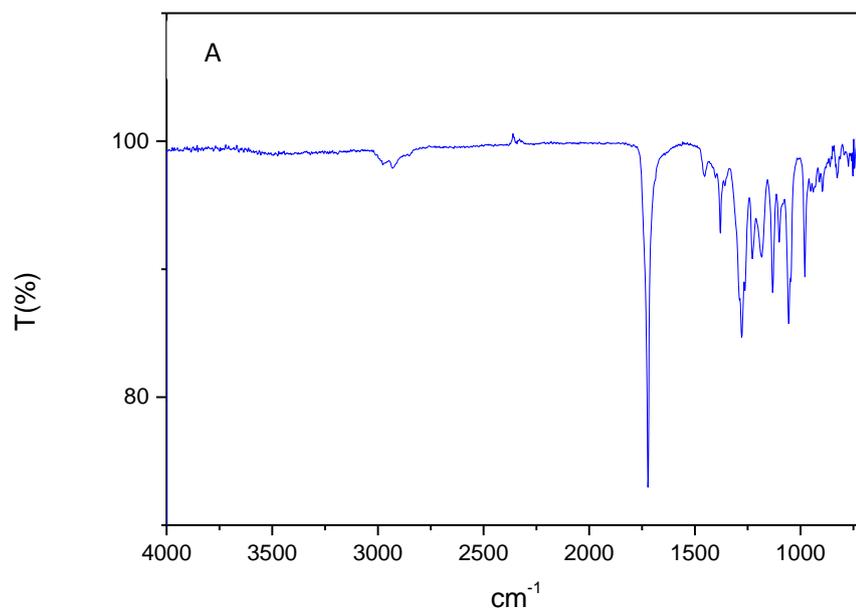


Fonte: Autora, 2019.

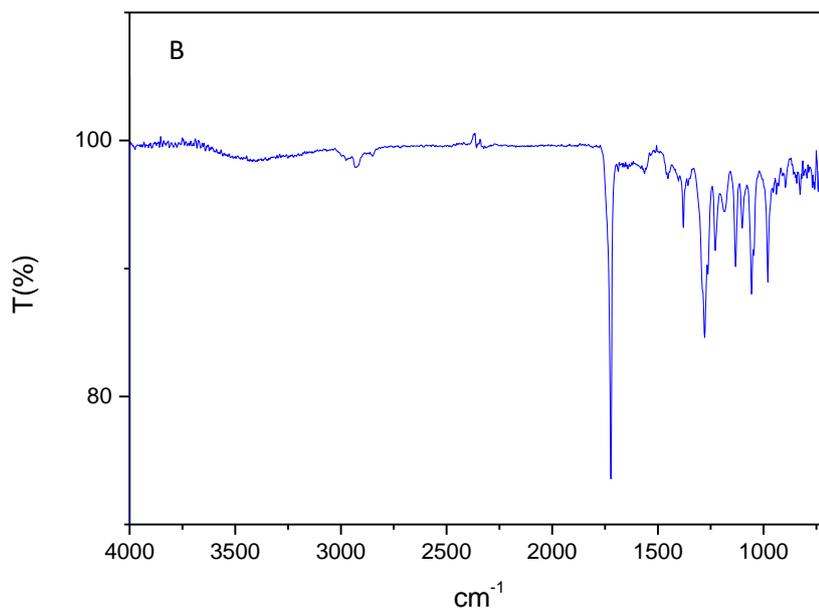


Fonte: Autora, 2019.

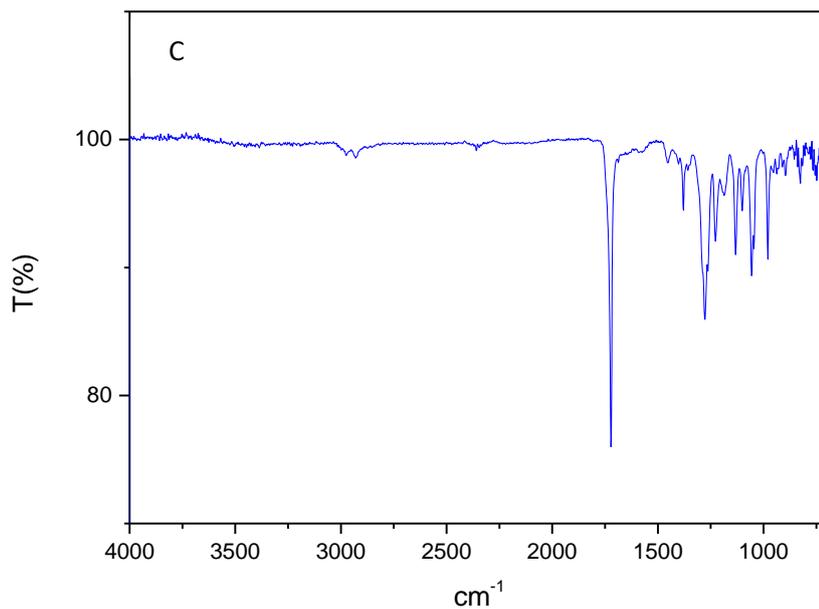
Figura 18 – Espectos de FTIR do P(3HB) obtido das extrações realizadas com clorofórmio (A), mistura (B) e hipoclorito de sódio (C) de biomassa crescida utilizando como substrato a glicose.



Fonte: Autora, 2019.



Fonte: Autora, 2019.



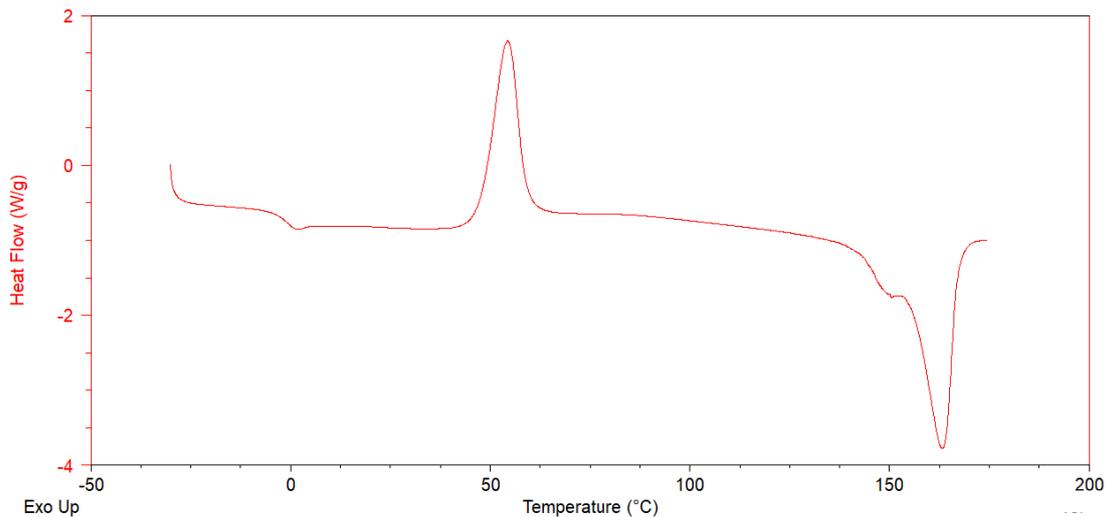
Fonte: Autora, 2019.

5.2.2.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A mobilidade das cadeias poliméricas determinam as características físicas do material, sendo a mobilidade diretamente proporcional a temperatura, a análise térmica dos polímeros é uma técnica de caracterização bastante importante para os polímeros. Os

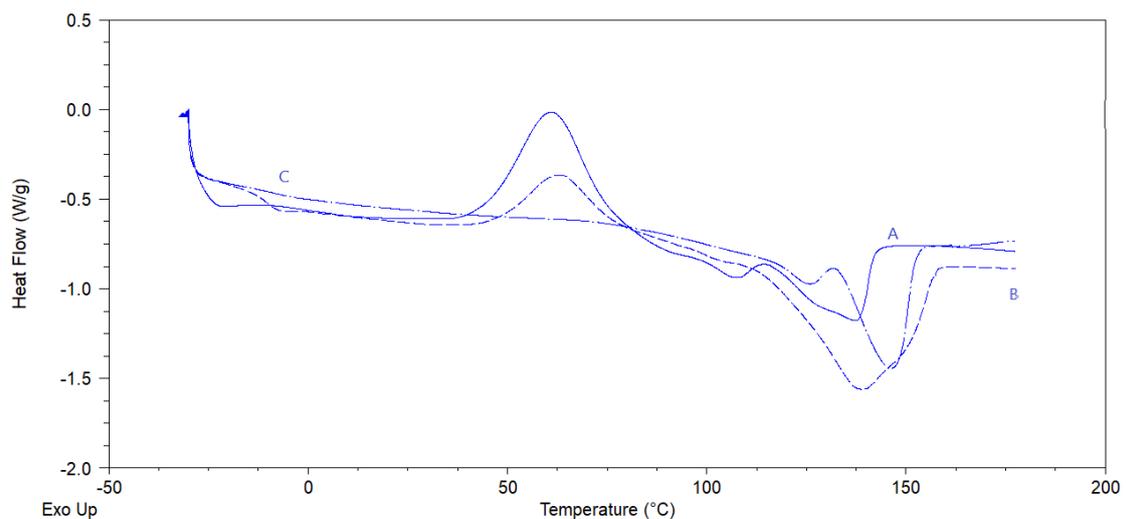
termogramas de DSC obtidos a partir do segundo ciclo de aquecimento para o P(3HB) de biomassa crescida em HCA, em glicerol residual e em glicose são mostrados nas Figuras 19, 20 e 21 respectivamente.

Figura 19 – Curva de DSC (segundo ciclo de aquecimento) do P(3HB) obtido da extração com clorofórmio de biomassa crescida utilizando como substrato o hidrolisado de casca de arroz



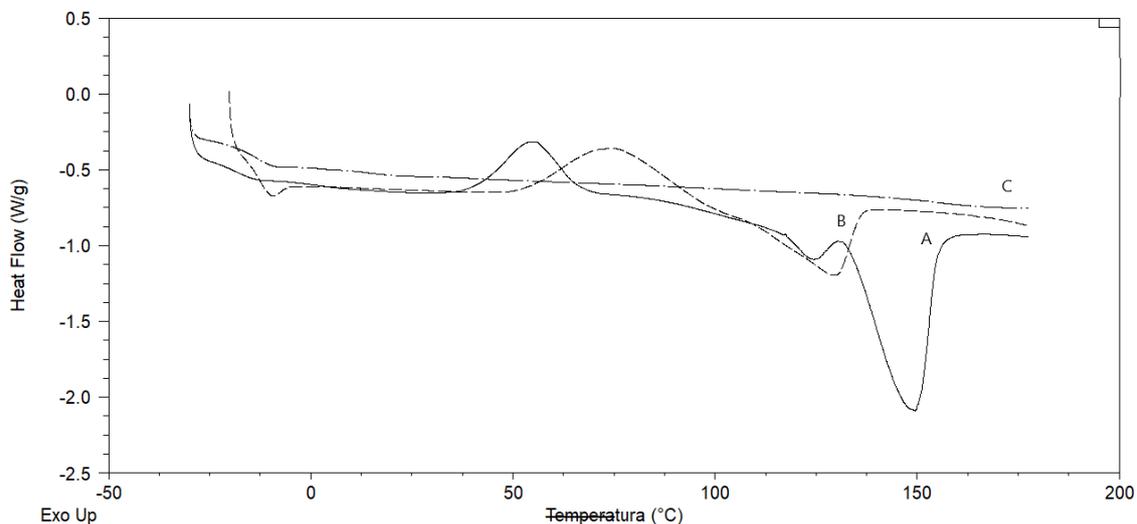
Fonte: Autora, 2019.

Figura 20 – Curva de DSC do P(3HB) (segundo ciclo de aquecimento) obtido das extrações realizadas com clorofórmio (A), hipoclorito de sódio (B), mistura (C) e de biomassa crescida utilizando como substrato glicerol residual.



Fonte: Autora, 2019.

Figura 21 – Curva de DSC do P(3HB) (segundo ciclo de aquecimento) obtido das extrações realizadas com clorofórmio (A), hipoclorito de sódio (B), mistura (C) e de biomassa crescida utilizando como substrato a glicose



As curvas revelam que a T_g do P(3HB) foi menor do que a T_g do P(3HB) comercial obtida da literatura (5°C) para todas as formulações, conforme se pode observar nos termogramas acima e nos dados da Tabela 12. Devido a T_g se tratar da temperatura onde o nível energético para a movimentação da cadeia é atingido, a mesma possui grande influência da massa molecular (CANEVAROLO, 2002). Diante dos valores obtidos, fica claro que os polímeros obtidos apresentaram baixa massa molecular. A partir da análise dos dados, um resultado interessante foi observado, o polímero obtido com a fonte de carbono HCA apresentou as melhores propriedades térmicas, uma vez que as temperaturas das transições foram mais próximas às dos valores de referência da literatura para o P(3HB). Ressalta-se que para a amostra preparada com glicerol residual e extraída com clorofórmio, a T_g não foi detectada por estar muito próxima da temperatura em que se iniciou o ciclo de aquecimento.

No segundo ciclo de aquecimento, além da T_g , as amostras apresentaram um pico exotérmico do processo de cristalização a frio (T_{cc}) e um pico endotérmico de fusão. As amostras apresentaram as propriedades bastante variadas, sendo que somente a amostra sintetizada com a fonte de glicose e extraída pela mistura se mostrou totalmente amorfa. A faixa de fusão dos polímeros obtidos ocorreram em temperaturas bem inferiores que o valor de referência para o P(3HB) de 175°C , corroborando para o fato de os polímeros possuírem baixa massa molecular. Durante o resfriamento, apenas

três amostras apresentaram o pico exotérmico de cristalização (T_c), como pode ser visto nos dados da Tabela 12. O material obtido com o HCA apresentou T_m de 163 °C, sendo a mais elevada dentre os materiais obtidos. Não foi possível obter uma correlação óbvia entre as diferentes fontes de carbono utilizadas e/ou os diferentes solventes extratores, sendo que no geral, as propriedades foram significativamente diferentes.

Tabela 12 – Dados de DSC do P(3HB) obtido nos diferentes experimentos

Substrato	Solvente	T_g (°C)	T_c (°C)	T_{cc} (°C)	ΔH_{cc} (J.g ⁻¹)	T_m (°C)	ΔH_m (J.g ⁻¹)
Glicose	Clorofórmio	-18	66	55	17,5	150	45,1
	Hipoclorito	-13	nd	76	27,1	129	24,6
	Mistura	-14	nd	nd	-	Nd	-
Glicerol Residual	Clorofórmio	nd	nd	61	46,8	138	25,1
	Hipoclorito	-11	73	64	19,1	139	69,8
	Mistura	-23	82	nd	-	146	29,7
Hidrolisado CA	Clorofórmio	-1	nd	54	54,7	163	92,3

n.d. – não detectado.

Fonte: Autora, 2019.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de resíduo de arroz como substrato para a *B. megaterium* na produção de polihidroxialcanoatos ainda não foi reportada na literatura. Os resíduos utilizados neste estudo possuem baixo valor agregado e grande disponibilidade, podendo auxiliar na redução dos altos custos de produção dos polihidroxialcanoatos.

Neste trabalho, mostrou-se que é possível a utilização de ambas as fontes de carbono na produção de P(3HB). Embora não tenha sido possível acompanhar o crescimento da bactéria no meio de cultivo, as análises feitas com a biomassa seca de uma das bateladas (meio contaminado), foram efetivas. Avaliando os parâmetros de crescimento celular é possível observar que a bactéria possui um aparato metabólico próprio para o consumo dos substratos utilizados. Mostrou-se eficiente de uma maneira similar no consumo dos substratos, cerca de 33,12 % em média de glicose e 44,2 % em média de glicerol residual.

Os resultados obtidos para extrações com clorofórmio, hipoclorito de sódio e a mistura de ambos foram próximos aos da literatura, indicando adequação da metodologia de extração. A utilização do hipoclorito como agente digestor se mostrou eficaz, diminuindo a utilização de solventes halogenados no processo e obtendo um conteúdo de polímero acumulado de 33% no cultivo, utilizando glicerol como fonte de carbono e 52% no cultivo utilizando glicose como fonte de carbono do total de massa seca. O polímero obtido através das três fontes de carbono foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho, os resultados obtidos condizem com os encontrados na literatura, evidenciando a produção de P(3HB) no presente trabalho. As análises de DSC mostraram os eventos característicos dos materiais poliméricos. Contudo, as baixas temperaturas encontradas apontam a produção de um polímero de baixa massa molecular, além disso, podem ter sido gerados variados co-polímeros o que também contribui para as propriedades encontradas. A amostra utilizando o hidrolisado de casca de arroz como fonte de carbono, mesmo apresentando contaminação e prejudicando o crescimento da *B. megaterium*, resultou em um P(3HB) com as temperaturas das transições mais próximas à do P(3HB) comercial, mostrando o potencial deste resíduo como fonte de carbono alternativa.

Em futuros experimentos sugere-se a reprodução dos parâmetros de cultivo propostos, com as mesmas condições, o aumento de escala (biorreator) e a utilização de processos em batelada alimentada, para aumentar o conteúdo de polímero acumulado e

melhorar a sua produtividade. É necessária a utilização de outras análises como a cromatografia gasosa e a de exclusão molecular, para quantificar o polímero ao longo do crescimento celular. Adotar um método mais efetivo de esterilização para hidrolisado da casca de arroz e padronizá-lo para que não acumule compostos tóxicos inibitórios. Testar outras propostas de metodologias que aumentem o teor de glicose no hidrolisado de casca de arroz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, P. B. S.; ARAÚJO, K. S.; SILVA, K. A. A.; HOULLOU, L. M.; LOCATELLI, G. O.; MALAFAIA, C. M. Potential production of bioplastics polyhydroxy alcanoates using residual glycerol. **Journal of Environmental Analysis and Progress** 03, p. 55-60, 2018.

ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, **Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2017**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br>. Rio de Janeiro: ANP, 2017.

ARRUDA, P.V.; RODRIGUES, R.C.; FELIPE, M.G. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista analítica**, nº 26, p. 56-62, 2007.

BABEL, W. Y.; STEINBÜCHEL, A. **Biopolyesters: special issue of advances in Biochemical Engineering Biotechnology**. 1ª ed. Berlim: Springer - Verlag, Alemanha, p. 342, 2001.

BARUD, H. S.; SOUZA, J. L.; SANTOS, D. B.; M. S. CRESPI; RIBEIRO, C A.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J.L. Bacterial cellulose/poly(3-hydroxybutyrate) composite membranes. **Carbohydrate Polymers** 83 (2011) 1279–1284.

BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M.; MÉLO, T. J. A. Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.6, p. 127-139 ISSN 1809-8797, Departamento de Engenharia de Materiais Universidade Federal de Campina Grande, 2011.

BRUNEL, D.G. **Influência da Incorporação de Aditivos nas Propriedades do Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato - PHBV**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia dos Materiais, São Carlos, São Paulo, Brasil, p. 181, 2008.

CANEVAROLO, S. V. **Ciência dos Polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. São Paulo: Art Liber Editora, p. 183, 2002.

CATONI, S.E.M. **Biossíntese e obtenção de PHB e PHBV plastificados com PEG visando aplicação em liberação controlada de fármacos**. Dissertação de Mestrado. Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Departamento de Engenharia de Processos, Joinville, Santa Catarina, Brasil, 87p., 2011.

CATONI, S. E. M.; TRINDADE, K. N.; GOMES, C. A .T; SCHNEIDER, A. L. S.; PEZZIN, A.P.T. Influence of Poly(Ethylene Glycol) – (PEG) on the Properties of Influence of Poly(3- Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) – PHBV. **Polímeros**, v. 23, n. 3, p. 320-325, 2013.

CHEN G. Q., Production of polyhydroxialcanoates in Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, **Elsevier**, p. 823, 2017.

CHODAK, I. Polyhydroxyalkanoates: Origin, Properties and Application. **Elsevier**, p. 451-477, 2008.

COELHO, S.T. **Panorama do Potencial de Biomassa no Brasil**. Brasília: ANEEL, 2002. p. 75.

DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. Elsevier Science & Technology Books, 1995.

FACCIN D. J. L.; MARTINS, I.; CARDOZO, N. S. M.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z.; ALVES, T. L. M.; GAMBETT, R.; SECCHI, A. R. Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium*. **Journal of Chemical Technology & Biotchnology**, v. 84, n. 12, p. 1756-1761, 2009.

FAO. Food and Agriculture Organization. 2011. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/t0567e/T0567E08.htm>. Acesso em: 10 jul 2019.

FOLLETO, E. L.; HOFFMANN, R.; HOFFMANN, R. S.; PORTUGAL J. R.; JAHN, S. J. Aplicabilidade das cinzas da casca de arroz. **Química Nova**, Vol. 28, No. 6, 1055-1060, 2005.

GALEGO, N.; ROZSA, C.; SÁNCHEZ, R.; FUNG, J.; Characterization and application of poly(β -hydroxyalkanoate). **Polymer Testing**. Volume 19. [doi 10.1016_s0142-9418(99)00011-2].

GARCÍA, Y. G.; MEZA, J. C. C.; REYNOSO, O. G.; LÓPEZ, J. A. C. Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. **Revista Internacional Contaminación Ambiental**, v. 29, n. 1, p. 77-115, 2013.

GARCIA, M. C. F. **Proposta de um processo de extração de poli(3-hidroxibutirato) produzido por *Cupriavidus necator* e seu efeito sobre as características do polímero**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia de Alimentos, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 158p., 2006.

GLANERT, A. C. C.; Produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* a partir de casca de soja. Trabalho de Conclusão de Curso Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2015.

HAHN, S. K.; CHANG, Y. K.; KIM, B. S.; CHANG, H. N. 1994. Optimization of Microbial Poly(3-hydroxybutyrate) Recovery Using Dispersions of Sodium Hypochlorite Solution and Chloroform: Communication to the Editor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 256 - 261.

HICKERT, L. R. **Bioconversão de hidrolisados de casca de arroz e soja a etanol e xilitol por leveduras**. Tese de Doutorado – Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2014.

HICKERT, L. R.; PEREIRA, F. C.; CRUZ, P. B. S.; ROSA, C. A.; AYUB, M. A. Z. Ethanogenic fermentation of co- cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and *Saccharomyces cerevisiae* ICVD254 in synthetic medium and rice hull hydrolysate **Bioresource Technology**. Volume 131, Março 2013, p. 508-514.

IBRAHIM, M. H. A; STEINBÜCHEL, A. (2009) Poly-(3Hydroxybutyrate) production from glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via high-cell-density fed-batch fermentation and simplified solvent extraction. **Appl Environ Microbiol** 75: 6222-6231. doi:10.1128/AEM.01162-09.

IRGA. Instituto Rio Grandense do Arroz. **Boletim de safra do ano de 2017 e 2018**. Disponível em: <https://www.irga.rs.gov.br/safras-2>. Acessado: 09/07/2019.

KIM. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. **Enzyme Microb. Technol.** 27, 774-777, 2000.

KUNASUNDARI, B; ARZA, CARLOS R; MAURER, F. H. J.; MAURER; GURJEET, K.; K. SUDESH. Biological recovery and properties of poly(3-hydroxybutyrate) from *Cupriavidus necator* H16. **Separation and Purification Technology** Volume issue 2016 [doi 10.1016_j.seppur.2016.07.043].

LEE, S. Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Trends in Biotechnology Letters**, v.14, p. 431-438, 1996.

LEE, S.Y.; CHOI, J. Effect of fermentation performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1, p. 431-438, 1997.

LEMOIGNE, M.; LENOEL C. P.; CROSON M.. Assimilation of acetylacetic acid and beta-hydroxybutyric acid by *B. megatherium*. **Ann. Inst. Pasteur (Paris)** 78:705–710. 1950.

LENZ, R. W.; MARCHESSAULT, R. H.; Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. **Biomacromolecules**, v. 6, p.1-8, 2005.

LOCATELLI, G.O. **Estudo das condições de hidrólise da pectina para uso como substrato na produção de polihidroxialcanoatos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Biotecnologia Industrial, Recife, Pernambuco, Brasil, 120p., 2012.

LUVIZETTO, D. J. **Cultivo da bactéria *Bacillus megaterium* para a produção do biopolímero Poli(3-hidroxibutirato) e modelagem matemática do bioprocesso**. Dissertação (Mestrado em Engenharia). Programa de Pós Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS 119 f., Porto Alegre, 2007.

MACHADO, M. L. C.; PEREIRA, N. C.; MIRANDA, L.F.; TERENCE, M. C. Estudo das propriedades mecânicas e térmicas do polímero Poli-3-hidroxibutirato (PHB) e de compósitos PHB/pó de madeira. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p. 65-71, 2010.

MAI, W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. **Journal of Chromatography A**, v. 445, p. 285-289, 1998.

MANTELLATO, P. E.; DURÃO, N. A. S.; Process for extracting and recovering polyhydroxyalkanoates(phas) from cellular biomass **U.S Pat.** 20080193987 A1 2008.

MARIN, E. P. **Espectroscopia de infravermelho e suas aplicações**. 2013. 73 f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/119826>>.

MCCOOL, G. J.; FERNANDEZ, T.; LI, N.; CANNON, M. C. Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*. **FEMS Microbiology Letters**, n. 138, p. 41-48 (1996).

MOURA, R. M. **Relembrando Anton De Bary e sua obra fitopatológica**. *Fitopatol. bras.* 2002, vol.27, n.4, pp. 337-343. ISSN 01004158. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582002000400001>.

MOTA, Claudio J. A.; SILVA, Carolina X. A. da and GONCALVES, Valter L. C.. **Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel**. *Quím. Nova*. 2009, vol.32, n.3, pp.639-648. ISSN 0100-4042. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000300008>.

NAJAFPOUR, G. D. Biochemical Engineering and Biotechnology. **Elsevier**, pp. 142-169. 2007.

Norma ABNT NBR 15448-1. **Embalagens plásticas degradáveis e/ou de fontes renováveis**. Parte 1: Terminologia.

OMAR, S.; RAYES, A.; EQAAB, A.; VOB, I.; STEINBUCHER, A. Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup a *Bacillus megaterium*. **Biotechnology Letters**, n. 23, p. 1119 – 1123 (2001).

PAULA, E. L.; CAMPOS, T. F.; MANO, V. Glicólise do poli(3-hidroxibutirato) por via enzimática. **Quím. Nova**, Vol. 37, No. 3, 487-491, 2014.

PEREIRA, S. M. F.; RODRIGUEZ, R. S.; GOMES, J. G. C.. Biosynthesis and characterization of biodegradable Poly (3-hydroxybutyrate) from renewable sources. **Matéria (Rio J.)**. 2008, vol.13, n.1, p.1-11. ISSN 15177076. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-70762008000100002>.

PHB INDUSTRIAL S. A.. **Biocycle: ciclo de vida**. Disponível em <http://www.biocycle.com.br/site.htm>. Acesso em: 08/03/19.

PIEMOLINI, L. T. **Modelagem estrutural da PHA sintase de *Chromobacterium violaceum* para estudos de mutação sítio-dirigida**. Florianópolis, 2004. (Dissertação Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina.

PIVA, A.M.; WIEBECK, H. **Reciclagem do plástico**. São Paulo: Artliber Editora, 2004.

POSADA, J.A.; NARANJO, A.J.M.; LÓPEZB, J.A.; HIGUITAA, J.C.; CARDONAA, C.A. Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 310-317, 2011.

POUEY, M. T. F. **Beneficiamento da cinza de casca de arroz residual com vistas á produção de cimento e/ou pozolânico**. Porto Alegre, 2006. 345 p. Programa de pós-graduação em engenharia civil, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

PRASANNA, T. P. A.; BABU, P.D.; LAKSHMI, R.; CHAKRAPANI, C.S.; RAO, V.R.: Production of poly (3-hydroxybutyrates) by *Bacillus* species isolated form soil. **J. Pharm. Res. Rev.**, 1, 15-18. 2011.

QUISPE, C. A. G.; CORONADO, C. J. R.; CARVALHO, J. A. Glycerol: Production, consumption, prices, chacterization and new trends in combustion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 27, p.475-493, 2013. Disponível: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.017>.

RAICHER, G. **Análise Economica da Produção de Polimeros Biodegradaveis no contexto de uma Biorefinaria a partir de cana- de-açucar**. 2011. 178 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)- Instituto de Ciencias Biomédica, Universidade de São Paulo.

RAMSAY, B. A., RAMSAY, J. A., JIANG, X., 2006 “Acetone extraction of mcl-PHA from *Pseudomonas putidas* KT2440”, **Journal of Microbiological Method**, v. 67, p. 212-219

RAZA A. Z.; ABIDA, S.; BANAT, M. I., Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 126, p.45-46, 2018.

REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; KALIA, V.C. Polyhydroxyalkanoates: na overview. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 137-146, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00212-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00212-2).

RITUPARNA DAS; NAYAN RANJAN SAHA; ARUNDHATI PAL; DIPANKAR CHATTOPADHYAY ; AMAL KANTI PAUL . Comparative evaluation of physico-chemical characteristics of biopolyesters P(3HB) and P(3HB-co-3HV) produced by endophytic *Bacillus cereus* RCL. *Front. Biol. Frontiers in Biology*. August 2018, Volume 13, p 297–308

ROSSI, D. M.; SOUZA, E. A.; FLORES, H.S.; AYUB, M. A. Z. **Efficient and maximized conversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol by a nem strain of *Klebsiella pneumoniae***. Tese (doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

SCHMIDT, M. **Produção de poli(3-hidroxi butirato) por *Cupriavidus necator* DSM 545 em meio suplementado com óleo de soja mini emulsionado.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Alimentos, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 125p., 2011.

SIEW, E. L.; RAJAB, N. F.; OSMAN, A. B.; SUDESH, K.; INAYAT-HUSSAIN, S. H. *In vitro* biocompatibility evaluation of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer in fibroblast cells. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**. vol. 81, p. 317-325. 2007. DOI: 10.1002/jbm.a.31000.

SHAH, A.; HASAN, F.; HAMEED, A.; AHMED, S.; **Biotech. Adv.**, 26, 246, 2008.

SOLAMAIN, D. K. Y.; ASHBY, R. D.; FOGLIA, T.A.; MARMER, W. N. Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v 71, n. 6, p.783-789, 2006.

SOUZA, P. P.; SILVA, G. G.; AMARAL, L. O. F. Transição Vítrea. **Química Nova**, n.20, 2004.

SPIER, V. C. **Caracterização espectroscópica e cromatográfica de copolímeros biodegradáveis.** Dissertação de Mestrado, Universidade do Estado de Santa Catarina, Departamento de Engenharia de Materiais, Joinville, Santa Catarina, Brasil, 2005.

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

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, v. 25, n. 10, p. 1503-1555, 2000.

TAKAHASHI, R.Y.U. **Bioprospecção de bactérias marinhas para a produção de polihidroxicanoatos.** Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale do Itajaí, Departamento de Ciência e Tecnologia Ambiental, Vale do Itajaí, Santa Catarina, Brasil, p.18 e p. 87.

TIAN, J; SINSKEY, A. J.; STUBBE, J. Kinetic Studies of Polyhydroxybutyrate Granule Formation in *Wautersia eutropha* H16 by Transmission Electron Microscopy. **Journal of Bacteriology**, vol. 187, 2005, p. 3814-3824.

TORRES, A. U.; ALMEIDA, J. R.; HABAS, J. P. Avaliação do Efeito de um Óleo Parafínico sobre o Comportamento Físico-Químico de Tubulações de Polietileno de Alta Densidade. **Polímeros**, vol. 20, n. especial, p. 331-338, 2010.

TORTORA, G. J; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 10º ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VALAPPIL, S. P.; MISRA, S. K.; BOCCACCINI, A.R.; KESHAVARZ, T.; BUCKE C.; ROY, I. 2007, Large scale production and eficiente recovery of PHB with desirable

material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. **Journal of Biotechnology**, v.132, p251-258.

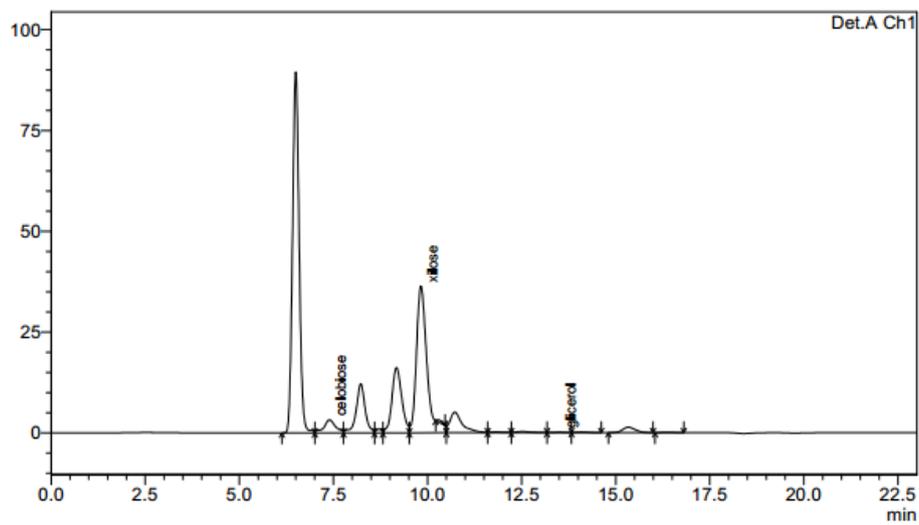
VARY, P. S.; BIEDENDIECK, R.; FUERCH, T.; MEINHARDT, F.; ROHDE, M.; DECKWER, W.D.; JAHN, D. *Bacillus megaterium*-from simple soil bacterium to industrial protein production host. **Microbiology and Biotechnology**, 76(5), pp. 957-967, 2007.

WEATHERBURN, M.W., 1967, "Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia", **Analytical Chemistry**, v. 39, pp. 971-974.

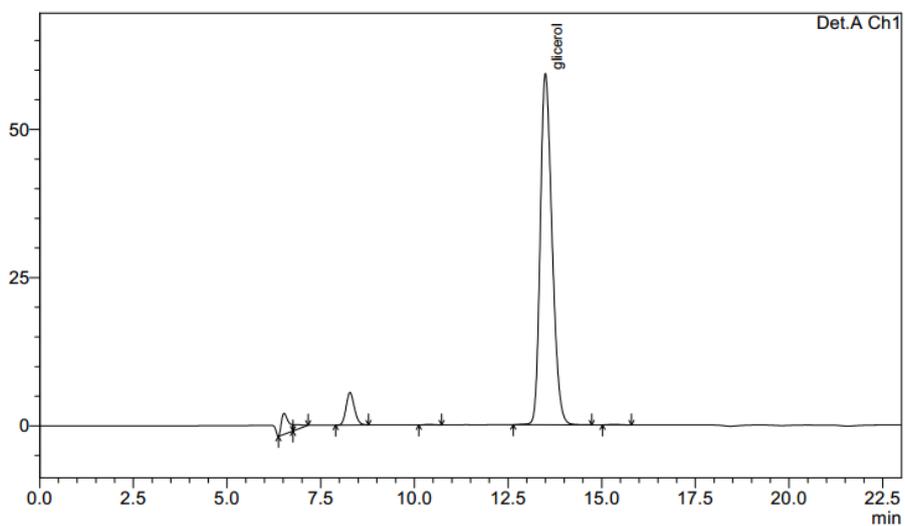
ANEXO A – Resultados da cromatografia líquida de alta eficiência

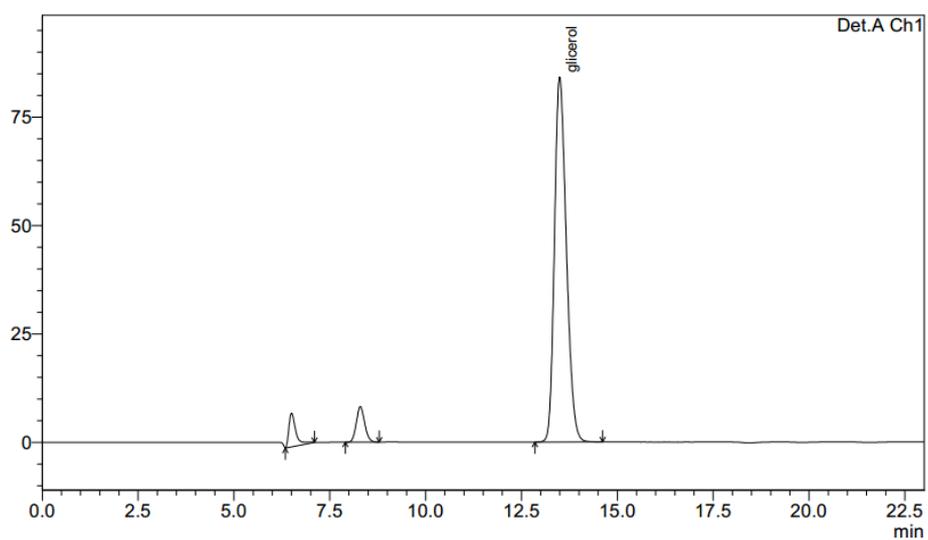
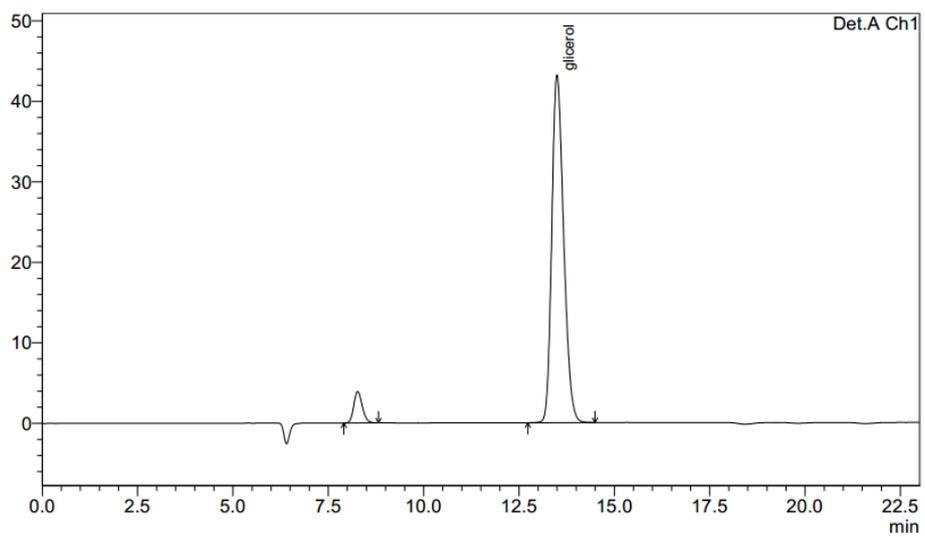
Figura A1 - Cromatogramas das amostras no início de cada cultivo testado.

Hidrolisado de casca de arroz



Glicerol residual





Glucose

