



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA



Avaliação de diferentes tipos de substrato para produção de P(3HB) por *B. megaterium*

Autor: Camila Pilatti Mainka

Orientadora: Profa. Dra. Débora Jung Luvizetto Faccin

Co-orientadora: Profa. Dra. Rosane Rech

Porto Alegre, janeiro de 13

Sumário

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vi
Lista de Símbolos	vii
Lista de Abreviaturas e Siglas	viii
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	3
2.1 Poliidroxialcanoatos (PHAs)	3
2.1.1 Biodegradabilidade	4
2.1.2 Propriedades	7
2.1.3 Custo	10
2.1.4 Poli-3-hidroxi-butirato (P(3HB))	10
2.2 Produção de PHA por <i>Bacillus megaterium</i>	11
2.3 Efluentes Industriais	13
3 Materiais e Métodos	14
3.1 Cultivo do micro-organismo	14
3.1.1 Ativação celular e inóculo	14
3.1.2 Fontes de Carbono	15
3.2 Análises	17
3.2.1 Biomassa	17
3.2.1 Poli(3-hidroxi-butirato)	17
4 Resultados e Discussão	19
4.1 Crescimento celular	19
4.2 Produção de polímero	20
4.3 pH	24
4.4 Co-polímero	25
5 Conclusões e Trabalhos Futuros	28
6 Referências	29
ANEXO A	34

Agradecimentos

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aos seus professores e funcionários, que, ao longo deste período, possibilitaram a mim todo esse processo evolutivo.

Às minhas orientadoras Débora Faccin e Rosane Rech pelo auxílio, pelos ensinamentos e principalmente por toda dedicação.

As amigas engenheiras (ou quase engenheiras) Camila Ribeiro e Caroline Agustini por terem estado ao meu lado desde o início e permanecendo assim em todos os momentos, especialmente nas horas difíceis.

Pelos colegas da Braskem, principalmente aqueles das áreas de Utilidades e Olefinas 1, por todos os ensinamentos e conhecimentos transmitidos, não só no âmbito técnico, mas, também, em relação à vida.

À minha Família e amigos, que sempre me incentivaram, ajudaram e souberam compreender minha ausência.

À mãe que todos gostariam de ter: a minha. Por ser meu exemplo diário, pelos primeiros ensinamentos, pela confiança, apoio, amor e, principalmente, amizade.

E ao homem mais legal que eu já conheci. Saulo, meu amor, pela compreensão e ajuda e por todas as vezes que ele disse que ia dar certo. E deu.

Resumo

O poli(3-hidroxi-butirato) é um poliéster biodegradável obtido a partir de fontes renováveis. Possui um grande potencial de aplicação, porém o fator econômico é um entrave na sua utilização e aplicação mais ampla. Os preços das matérias-primas para sua produção desempenham um papel crucial para a economia do processo.

Neste trabalho foi avaliada a produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* utilizando diferentes fontes de carbono. Os substratos utilizados são provenientes de efluentes industriais. Foram utilizados efluente da indústria do biodiesel, efluente da indústria de laticínio e efluente da indústria de transformação da soja. Para isso, realizou-se um cultivo em batelada de cada um dos substratos com a *B. megaterium* em estufa incubadora rotatória durante 48 h. Foram retiradas amostras e obtidos valores de pH, biomassa e concentração de polímero iniciais e nos tempos de 24 h e 48 h, uma vez que as amostragens são destrutivas e a estufa possui um número limitado de garras para comportar os frascos de cultivo amostras. Todos os testes foram realizados em duplicata. Mantiveram-se constantes as condições de temperatura e velocidade de agitação. A biomassa foi determinada pelo método gravimétrico e a quantidade de P(3HB) foi obtida pela quebra do polímero por meio de propanólise com subsequente quantificação utilizando cromatografia gasosa.

Foi verificado que *B. megaterium* acumulou polímero em todos os substratos empregados no presente estudo, evidenciando potencial para produção de P(3HB) nos efluentes testados.

Nas amostras cultivadas com os efluentes da indústria de laticínios (soro de leite e permeado de soro), bem como com o efluente da indústria de soja, foi observado um leve decréscimo na concentração de biomassa no meio entre as 24 h e 48 h. Igualmente, a concentração de polímero no meio diminuiu, indicando que houve consumo do mesmo. O consumo pode ter sido ocasionado por limitação de algum micronutriente ou mesmo por limitação de fonte de nitrogênio. Os valores máximos de acúmulo de polímero foram, portanto, obtidos no tempo de 24 h, alcançando fração mássica de polímero na biomassa seca de 15 %, 22 % e 30 %, para o soro de leite, permeado de soro e efluente da indústria de soja, respectivamente.

Já para a amostra cultivada com o efluente da indústria de biodiesel (glicerol residual), foi constatado um aumento da concentração de biomassa no meio, indicando crescimento celular, no mesmo intervalo de tempo descrito acima. Do mesmo modo, verificou-se aumento da concentração de polímero no meio. O valor máximo de acúmulo de polímero foi obtido após as 48 h, chegando em 37 % da biomassa seca. Cabe ressaltar que foi utilizado glicerol residual oriundo da produção de biodiesel sem nenhuma purificação posterior.

Além disso, pela análise do cromatograma obtido para o cultivo com permeado de soro de leite e para o cultivo com glicerol residual, foi observado um pequeno pico entre os picos do P(3HB) e do ácido benzoico, indicando que pode ter ocorrido a formação de um co-polímero.

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura geral dos polihidroxicanoatos e alguns membros representativos (adaptado de Lee <i>et al.</i> , 1996b).	4
Figura 2. Classificação de polímeros quanto a biodegradabilidade e origem de obtenção (adaptado de Shen <i>et al.</i> , 2009).	5
Figura 3. Degradação de amostra do Biopol, incubados em diferentes locais (1-10) monitorados a cada 5 semanas. Locais: 1) rio Danúbio; 2) lodo na margem do rio Danúbio; 3) solo da floresta; 4) solo de campo; 5) estufa com turfa úmida; 6) estação de tratamento de esgoto (ETE), flotador; 7) ETE, tanque de aeração; 8) ETE, tanque pós-tratamento aeróbio 9) ETE, tanque com lodo de biorreator anaeróbio; 10) caçamba de lixo municipal (MATAVULJ e MOLITORIS, 2000).	6
Figura 4. Degradação de amostra do Biopol, incubado em estufa com compostagem (MATAVULJ e MOLITORIS, 2000).	7
Figura 5. Curva de calibração com P(3HB) padrão (Sigma-Aldrich).	18
Figura 6. Curva de crescimento celular de <i>B. megaterium</i> para o cultivo com as diferentes fontes de carbono.	19
Figura 7. Curva de concentração de polímero no meio para o cultivo com as diferentes fontes de carbono.	20
Figura 8. Variação do pH do meio para os cultivos pela <i>B. megaterium</i> utilizando diferentes fontes de carbono.	24
Figura 9. Cromatograma obtido pela análise da amostra cultivada com permeado de soro de leite.	26
Figura 10. Cromatograma obtido pela análise da amostra cultivada com glicerol residual.	27

Lista de Tabelas

Tabela 1. Gêneros de bactérias capazes de acumular PHAs (Braunegg et al., 2004).	3
Tabela 2. Degradação de amostras de Biopol® (adaptado de Matavulj e Molitoris, 2000). 6	
Tabela 3. Propriedades de alguns PHAs e de alguns polímeros petroquímicos (adaptada de Lee, 1996a; Sudesh, 2000).	8
Tabela 4. Possíveis aplicações (adaptado de PHB Industrial, 2012).	9
Tabela 5. Estimativas do mercado atual de PHA e projeção para 2020 de acordo com as empresas Telles e Kaneka (adaptado de Shen <i>et al.</i> , 2009).	9
Tabela 6. Potencial técnico de substituição para os PHAs de acordo com Talles e Kaneka (adaptado de Shen <i>et al.</i> , 2009).	11
Tabela 7. Produção de PHA por <i>Bacillus</i> sp. NQ – 11/A2, identificada como <i>B. megaterium</i> , utilizando diferentes fontes de carbono (adaptada de Prabhu <i>et al.</i> , 2010).	12
Tabela 8. Composição do meio mineral e solução de micronutrientes.	15
Tabela 9. Composição do efluente da indústria do biodiesel.	16
Tabela 10. Composição típica do soro e permeado de leite obtido através de ultrafiltração – fator de concentração igual a 5 (volume/volume) (adaptado de HOFFMANN, 2003).	16
Tabela 11. Composição típica do efluente de uma indústria de produção de isolados proteicos a base de soja (adaptado de Salvadori <i>et al.</i> , 2012).	17
Tabela 12. Acúmulo de polímero pela <i>B. megaterium</i> nas amostras após 24 e 48 h para as diferentes fontes de carbono.	21

Lista de Símbolos

- M massa dos frascos com biomassa (g)
- m massa dos frascos vazios (g)
- V_a Volume de amostra coletado (L)
- PHB concentração de P(3HB)
- X biomassa total

Lista de Abreviaturas e Siglas

3HB 3-hidroxibutirato

3HV 3-hidroxivalerato

4HB 4-hidroxibutirato

ABIPLAST Associação brasileira da indústria do plástico

ABS acrilonitrila butadieno estireno

DBO demanda biológica de oxigênio

DLH dispositivo de liberação hormonal

DQO demanda química de oxigênio

ETE estação de tratamento de esgoto

P(3HB) poli(3-hidroxibutirato)

P(3HB-co-3HA) poli(3-hidroxibutirato-co-3HA*) *Unidades de 3HA: 3-hydroxidecanoato (3 mol %), 3-hidroxidodecanoato (3 mol %), 3-hidroxiocetanoato (< 1 mol %), 3-hidroxi-cis-dodecanoato (< 1 mol %)

P(3HB-co-3HV) poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)

P(3HB-co-3HHx) poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato)

P(3HB-co-4HB) poli(3-hidroxibutirato-co-4- hidroxibutirato)

P(3HV) poli(3-hidroxivalerato)

P(4HB) poli(4-hidroxibutirato)

P(3HHx-co-3HO) Poli(3-hidroxihexanoato-co-3-hidroxiocetanoato)

PA poliamida

PA11 poliamida 11 (nylon 11)

PA6 poliamida-6, nylon-6, policaprolactama

PA610 poliamida 610 (nylon 610)

PA66 poliamida 66 (nylon66)

PB polibutileno

PBS polibutileno succinato

PBSA poli(butileno succinato-co-butileno adipato)

PBSAT poli(butileno succinato-co-adipato tereftalato)

PBSL polibutileno succinato-co-lactato

PBST poli(butileno-succinato-tereftalato)

PBT polibutileno tereftalato

PC policarbonato

PCBS poli(l-cistinabisamida-g-sulfadiazina)

PCL policaprolactona

PE polietileno

PEAD polietileno de alta densidade

PEBD polietileno de baixa densidade

PEIT polietileno-co-isosorbitol tereftalato

PET politereftalato de etileno

PTT politrimetileno tereftalato

PLA poli(ácido láctico)

PMMA polimetilmetacrilato

POM poliacetal

PP polipropileno

PS poliestireno

PTMAT politetrametileno adipato tereftalato

PUR poliuretano

PVC policloreto de polivinila

UV radiação ultravioleta

1 Introdução

Na sociedade atual os plásticos têm papel fundamental. Eles são materiais versáteis de grande qualidade para aplicação nos mais variados produtos. O uso de materiais plásticos é cada vez mais frequente e este vem substituindo matérias-primas convencionais, como papel, papelão, vidros e metais, em função do seu baixo custo e grande durabilidade.

Segundo a ABIPLAST em 2005 o consumo per capita de produtos plásticos no Brasil foi de 23 kg·hab⁻¹ e as perspectivas para 2015 demonstram que este consumo irá dobrar, situando-se em 46 kg·hab⁻¹. Só em 2011 o consumo aparente de transformados plásticos, definido pela produção nacional somado à diferença entre importações e exportações, foi de 6,894 mil toneladas, movimentando cerca de 52 bilhões de reais.

Entretanto estes materiais têm despertado grande preocupação devido ao fato de serem descartados muito rápido como, por exemplo, na aplicação de embalagens para alimentos. Pesquisa da Maxiquim, consultoria especializada no segmento industrial, desenvolvida com base em 2011, aponta que no período foram gerados 3,4 milhões de toneladas de plástico pós-consumo e apenas 21,7 %, ou seja, 736 mil toneladas, foram recicladas. O grande volume de plásticos pós-consumo gerado, aliado a maneira incorreta de descarte destes, vem se tornando um sério problema ambiental.

O principal motivo é o fato deles não serem biodegradáveis, persistindo como agentes poluidores durante longos anos e quando depositados em aterros sanitários prejudicam a circulação de gases e a troca de líquidos resultantes do processo de decomposição da matéria orgânica. Sendo assim, está havendo um grande esforço no sentido de desenvolver polímeros biodegradáveis com propriedades similares as dos plásticos convencionais, de modo a substituir estes em aplicações semelhantes.

O primeiro polímero termoplástico artificial "celuloide" foi inventado na década de 1860. Desde então, vários novos compostos derivados de recursos renováveis têm sido desenvolvidos. No entanto, muitas das invenções relacionadas com biopolímeros entre 1930 e 1940 mantiveram-se em fase de laboratório e nunca foram utilizadas para a produção comercial. O principal motivo foi a descoberta de petróleo bruto e seu uso em larga escala industrial para polímeros sintéticos desde 1950.

Hoje em dia, com a maior conscientização global com a segurança do meio ambiente, bem como os limitados recursos de combustíveis fósseis, direcionam governos, empresas e cientistas a encontrarem alternativas ao petróleo bruto. Bioplásticos podem oferecer contribuições importantes, reduzindo a dependência dos combustíveis fósseis e os impactos ambientais relacionados. Nas últimas duas décadas, os biopolímeros experimentaram um renascimento. Muitos novos polímeros a partir de matérias-primas renováveis foram desenvolvidos.

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são uma classe de biopolímeros que surgem como alternativa a polímeros petroquímicos. A diversidade de PHAs existentes possibilita uma variada gama de propriedades, podendo apresentar características que vão de termoplásticos a elastômeros e tendo, assim, potencial para utilização em muitas aplicações. Após a sua descoberta em 1926 por Maurice Lemoigne, a partir da bactéria

Bacillus megaterium, cerca de 150 diferentes PHAs foram identificados. Dentre os PHAs destaca-se o poli(3-hidroxi-butirato) ou P(3HB). Este possui propriedades semelhantes ao polipropileno que, segundo a ABIPLAST foi a resina termoplástica mais consumida no Brasil em 2011 com 25 % de participação, a frente do PEAD (21 %) e do PVC (16 %).

Dentre as características que tornam os PHAs atrativos destaca-se o fato destes serem completamente biodegradáveis tanto em condições anaeróbicas quanto em condições aeróbicas.

Os PHAs são poliésteres sintetizados por diferentes micro-organismos, sendo que mais 30 % das espécies de bactérias que habitam o solo são capazes de sintetizar PHAs. As bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* possuem características interessantes para aplicações industriais como tolerância a alta temperatura e alta pressão osmótica, além de apresentarem um rápido crescimento celular sob condições adequadas. Mas sua característica mais marcante é a capacidade de produzir P(3HB) a partir de diversas fontes de carbono, como sacarose, lactose, maltose, glicerol. Além disso, a *B. megaterium* é capaz de sintetizar copolímeros a partir de uma única fonte de carbono.

Estudos em andamento não só visam os aspectos sustentáveis dos PHAs, mas também buscam considerar o fator econômico que até hoje é a principal desvantagem e entrave na utilização e aplicação mais ampla dos PHAs, bem como do seu uso como substituto dos polímeros petroquímicos. A fim de serem competitivos com plásticos comuns, os custos de produção dos PHAs devem ser minimizados. Os preços das matérias-primas para a produção de PHAs desempenham um papel crucial para a economia do processo. Atualmente as matérias-primas utilizadas para a produção de PHAs são substratos de valor elevado, como sacarose, óleos vegetais e ácidos graxos. A busca por substratos mais baratos cada vez mais vem sendo estudada, como a utilização de resíduos industriais como o soro de leite, glicerol residual, melaço de cana entre outros.

Inserido neste contexto, o presente trabalho trata da avaliação de diferentes tipos de substrato para produção de P(3HB) pela *B. megaterium*. Foi avaliado o crescimento de biomassa, bem como a produção de P(3HB), a partir de fontes de carbono diferentes, provenientes de efluentes industriais. O uso de efluentes industriais se mostra vantajoso devido ao seu baixo preço aliado à produção de um produto com alto valor agregado. Este ganho se reflete não só ao produtor, mas também reduz os custos associados à disposição desse efluente, bem como o impacto ao meio ambiente. Os efluentes analisados foram: efluente da indústria do biodiesel (glicerol residual como alternativa para reaproveitamento de resíduo da produção de biodiesel, uma vez que a sua crescente produção de tem gerado um excedente de glicerol e, conseqüentemente, uma queda no seu preço de venda), efluente da indústria de laticínios (soro de leite e permeado de soro, devido a sua grande disponibilidade: 80 % a 90 % do volume de leite transformado) e efluente da indústria de transformação da soja.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Polihidroxicanoatos (PHAs)

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres naturais sintetizados por microorganismos e armazenados intracelularmente, sendo acumulados como grânulos dentro do citoplasma das células. Os PHAs ocorrem naturalmente numa variedade de microorganismos, servindo como reserva de carbono e energia. Mais de 300 diferentes microorganismos sintetizam e acumulam intracelularmente PHAs, como bactérias, bactérias recombinantes, leveduras recombinantes e plantas transgênicas. A Tabela 1 mostra os diferentes gêneros de bactérias capazes de sintetizar PHAs (OTA, 1993; BRAUNEGG *et al.*, 2004).

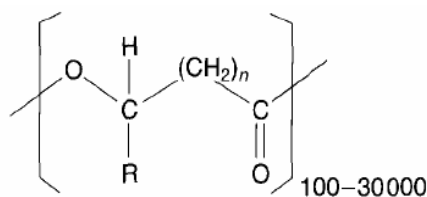
Tabela 1. Gêneros de bactérias capazes de acumular PHAs (Braunegg *et al.*, 2004).

<i>Acinetobacter</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Paracoccus</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Ferrobacillus</i>	<i>Pedomicrobium</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Gamphosphaeria</i>	<i>Photobacterium</i>
<i>Aphanothece</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Aquaspirillum</i>	<i>Halobacterium</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Asticcaulus</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Rhodobacter</i>
<i>Azomonas</i>	<i>Lamprocystis</i>	<i>Rhodococcus</i>
<i>Azopirillum</i>	<i>Lampropedia</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>
<i>Azobacter</i>	<i>Leptothrix</i>	<i>Rhodospirillum</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Methanomonas</i>	<i>Sphaerotilus</i>
<i>Beggiatoa</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Beijerinckia</i>	<i>Methylocystis</i>	<i>Spirulina</i>
<i>Beneckea</i>	<i>Methylomonas</i>	<i>Stella</i>
<i>Caryophanon</i>	<i>Methylovibrio</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Caulobacter</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Syntrophomonas</i>
<i>Chloroflexus</i>	<i>Microcoleus</i>	<i>Thiobacillus</i>
<i>Chlorogloea</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Thiocystis</i>
<i>Chromatium</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Thiodictyon</i>
<i>Chromobacterium</i>	<i>Mycoplana</i>	<i>Thiopedia</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Nitrobacter</i>	<i>Thiosphaera</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Nitrococcus</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Derxia</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Xanthobacter</i>
<i>Ectothiorhodospira</i>	<i>Oceanospirillum</i>	<i>Zoogloea</i>

As bactérias produtoras de PHAs podem ser divididas em dois grupos. No primeiro grupo encontram-se aquelas que necessitam limitação de algum nutriente (N, P, Mg, K, O, entre outros) e excesso de carbono para que haja síntese de PHAs. Neste grupo destacam-se *Alcaligenes eutrophus*, *Protomonas extorquens* e *Pseudomonas oleovorans*. O outro grupo não necessita limitação de nutrientes e a síntese de PHAs ocorre ainda na fase de crescimento celular. No segundo grupo encontra-se a bactéria *Alcaligenes latus* e a *Bacillus megaterium* (LEE, 1996b, OMAR *et al.*, 2001).

Segundo Cavalheiro *et al.* (2009), até o momento, cerca de 150 diferentes PHAs foram identificados. Entre os vários constituintes, o poli(3-hidroxiбутirato) [P(3HB)] é o poli-hidroxiálcanoato mais estudado. Após a sua descoberta em 1926 por Maurice Lemoigne a partir da bactéria *B. megaterium*, uma grande variedade de PHAs diferentes foram relatados possuindo diferentes números de átomos de carbono da cadeia principal e diferentes tipos de grupos funcionais (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995; LEE *et al.*, 1999).

A Figura 1 mostra a fórmula genérica para os PHAs onde n é 1 (para todos os polímeros comercialmente relevantes) e R pode ser hidrogênio ou cadeias carbônicas até C₁₆.



n=1	R=hidrogênio	Poli(3-hidroxiúpropanato)
	R=metila	Poli(3-hidroxiúbutirato)
	R=etila	Poli(3-hidroxiúvalerato)
	R=propila	Poli(3-hidroxiúhexanoato)
	R=pentila	Poli(3-hidroxiúoctanoato)
	R=nonila	Poli(3-hidroxiúdecanoato)
n=2	R=hidrogênio	Poli(4-hidroxiúbutirato)
	R=metila	Poli(4-hidroxiúvalerato)
n=3	R=hidrogênio	Poli(5-hidroxiúvalerato)
	R=metila	Poli(5-hidroxiúhexanoato)
n=4	R=hexila	Poli(6- hidroxiúdecanoato)

Figura 1. Estrutura geral dos polihidroxiálcanoatos e alguns membros representativos (adaptado de Lee *et al.*, 1996b).

Os PHAs são bons candidatos para a substituição ampla dos atuais plásticos provenientes de matéria-prima fóssil, uma vez que os PHAs podem apresentar propriedades semelhantes aos polímeros petroquímicos. A grande variedade de monômeros existentes constituintes de PHAs permite a obtenção de uma gama de polímeros com diferentes propriedades. Mas a crescente atenção dada aos PHAs se deve principalmente ao fato deles serem completamente degradáveis, gerando dióxido de carbono (e metano em caso de anaerobiose) e água, sendo assim, nem a sua produção nem a sua utilização ou degradação possuem impacto ecológico negativo (BRAUNEGG *et al.*, 2002; SURIYAMONGKOL *et al.*, 2007).

2.1.1 Biodegradabilidade

Atualmente, os termos bioplásticos e biopolímeros são muitas vezes usados como sinônimos, sendo empregados para referenciar tanto polímeros produzidos diretamente por micro-organismos como polímeros derivados de fontes biológicas e, às vezes, para denotar polímeros biodegradáveis (FACCIN, 2012).

A Figura 3 foi obtida do relatório elaborado pelas associações European Bioplastics e European Polysaccharide Network of Excellence (SHEN *et al.*, 2009) e nela são apresentados alguns polímeros obtidos a partir de fontes renováveis, parcialmente obtidos de fontes renováveis e obtidos a partir de fonte fósseis dispostos conforme sua biodegradabilidade.

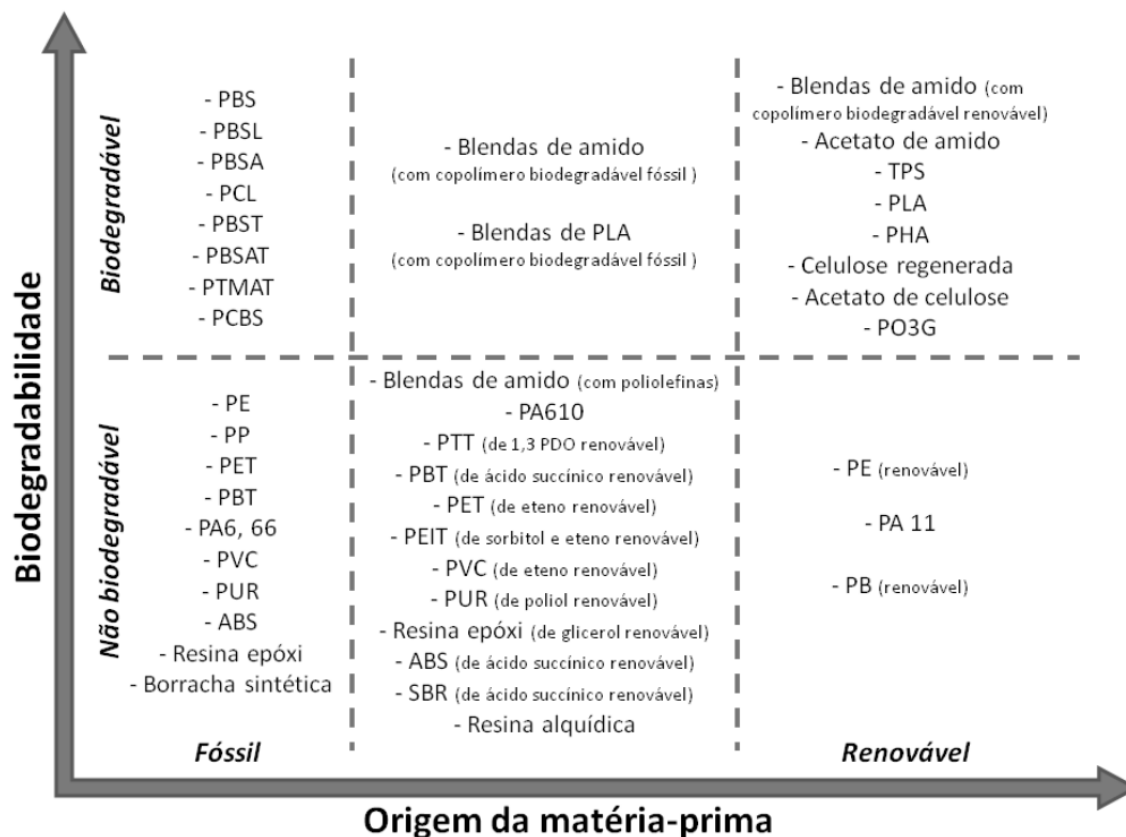


Figura 2. Classificação de polímeros quanto a biodegradabilidade e origem da matéria-prima (adaptado de Shen *et al.*, 2009).

Dentre as características que tornam os PHAs atrativos destaca-se o fato de estes serem completamente biodegradáveis tanto em condições anaeróbicas quanto em condições aeróbicas. A biodegradação é um processo natural no qual um composto orgânico é degradado, por ação de micro-organismos e suas enzimas, e convertido a compostos mais simples, mineralizados e redistribuídos através dos ciclos elementares como o ciclo de carbono, de nitrogênio e de enxofre (CHANDRA e RUSTGI, 1998; SHEN *et al.*, 2009).

Matavulj e Molitoris (2000) estudaram a biodegradação de amostras de Biopol® (P(3HB-co-3HV) copolímero comercial), recortados de frascos de xampu (30 mm × 10 mm × 1 mm). As amostras foram monitoradas durante 1 ano e foi avaliada a perda de massa através de pesagem e também visualmente. A Tabela 2 lista os 11 ambientes em que as amostras foram submetidas, bem como sua porcentagem de degradação e o tempo relacionado.

Tabela 2. Degradação de amostras de Biopol® (adaptado de Matavulj e Molitoris, 2000).

N°	Local	Biodegradação (%)	Tempo (semana)
1	Rio Danúbio	30	50
2	Lodo na margem do Rio Danúbio	60	50
3	Solo de floresta	11	50
4	Solo de campo	16	50
5	Estufa com turfa úmida	100	40
6	ETE, flotorador	90	50
7	ETE, tanque de aeração	100	50
8	ETE, tanque pós-tratamento aeróbico	100	50
9	ETE, tanque com lodo de biorretor anaeróbico	16	50
10	Caçamba de lixo municipal	100	45
11	Estufa com compostagem úmida	100	11

As Figuras 3 e 4 mostram as amostras que foram dispostas nos ambientes mencionados acima. Embora as amostras incubadas nos ambientes 1 até 4 e 9 não apresentem degradação visual, os autores observaram perda de massa. As amostras dispostas em estufa com compostagem úmida apresentaram degradação acelerada (Figura 4).

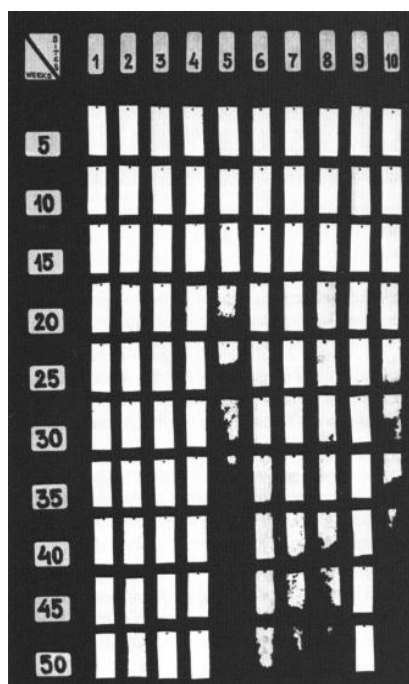


Figura 3. Degradação de amostra do Biopol, incubados em diferentes locais (1-10) monitorados a cada 5 semanas. Locais: 1) rio Danúbio; 2) lodo na margem do rio Danúbio; 3) solo da floresta; 4) solo de campo; 5) estufa com turfa úmida; 6) estação de tratamento de esgoto (ETE), flotorador; 7) ETE, tanque de aeração; 8) ETE, tanque pós-tratamento aeróbico 9) ETE, tanque com lodo de biorretor anaeróbico; 10) caçamba de lixo municipal (MATAVULJ e MOLITORIS, 2000).

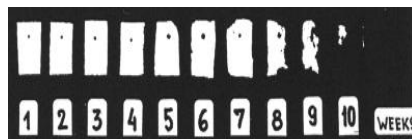


Figura 4. Degradação de amostra do Biopol, incubado em estufa com compostagem (MATAVULJ e MOLITORIS, 2000).

2.1.2 Propriedades

O número estruturas de PHAs que é hoje em dia acessível possibilita a utilização destes biopolímeros em diversas aplicações, pois estes podem apresentar características de termoplásticos ou de elastômeros, dependendo das condições de cultivo e micro-organismos utilizados (BRAUNEGG *et al.*, 2002; FACCIN, 2012). A Tabela 3 apresenta algumas propriedades dos PHAs e de alguns polímeros petroquímicos.

Através da variação do comprimento da cadeia carbônica na subunidade (monômero) do PHA a hidrofobicidade é afetada e um número de outras propriedades incluindo temperatura de transição vítrea, temperatura de fusão e nível de cristalinidade (SHEN *et al.*, 2009, *Apud* (METABOLIX, 2007b)).

Hoje em dia, os PHA comercialmente disponíveis podem ser utilizados para moldagem por injeção, extrusão e revestimento de papel. A Tabela 4 demonstra a sua vasta gama de aplicações (PHB Industrial, 2012).

A Tabela 5 fornece estimativas sobre o mercado atual de PHA e a projeção para 2020 de acordo com duas empresas, Telles e Kaneka. Hoje em dia os mercados de embalagens e filmes agrícolas são os mais importantes para PHAs. No futuro, as aplicações tornam-se mais diversificadas. É esperado que os PHAs ganhem espaço no mercado em edifícios, têxteis, transporte e utilidades domésticas. Além de uso em aplicações descartáveis, os produtores de PHA também visam produtos duráveis (SHEN *et al.*, 2009).

Além disso, devido a um bom desempenho dos PHAs em termos de biocompatibilidade e de absorção em tecido humano, estes podem ser utilizados no campo da medicina, incluindo a engenharia de tecidos, cicatrização, doenças cardiovasculares, ortopedia, entre outros. Suturas feitas de PHA, esôfago artificial e vasos sanguíneos artificiais são atualmente oferecidos como produtos comerciais (CHEN, 2010; TEPHA, 2012).

Tabela 3. Propriedades de alguns PHAs e de alguns polímeros petroquímicos (adaptada de Lee, 1996a; Sudesh, 2000).

	Temperatura de fusão (°C)	Módulo de Young (GPa)	Tensão de cisalhamento (MPa)	Resistência à ruptura (%)
P(3HB)	179	3,5	40	5
P(3HB-co-3HV) ¹				
3 mol % 3HV	170	2,9	38	-
9 mol % 3HV	162	1,9	37	-
14 mol % 3HV	150	1,5	35	-
20 mol % 3HV	154	1,2	32	-
25 mol % 3HV	137	0,7	30	-
71 mol % 3HV	83			
P(3HB-co-4HB) ²				
3 mol % 4HB	166	-	28	45
10 mol % 4HB	159	-	24	242
16 mol % 4HB	-	-	26	444
64 mol % 4HB	50	30	17	591
90 mol % 4HB	50	100	65	1080
P(3HB-co-3HHx) ³				
17 mol % 3HHx			20	850
25 mol % 3HHx	52			
P(3HB-co-3HA) ⁴				
6 mol % 3HA	133	0,2	17	680
P(4HB) ⁵	53	149	149	1000
P(3HHx-co-3HO) ⁶	61	-	10	300
PP	170	1,7	34,5	400
PET	262	2,2	56	7300
OS	110	3,1	50	-
PEBD	130	0,2	10	620

¹ Poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato)² Poli(3-hidroxi butirato-co-4-hidroxi butirato)³ Poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato)⁴ Unidades de 3HA: 3-hidroxi decanoato (3 mol %), 3-hidroxi dodecanoato (3 mol %), 3-hidroxi octanoato (< 1 mol %), 3-hidroxi-cis-dodecanoato (< 1 mol %)⁵ Poli(4-hidroxi butirato)⁶ Poli(3-hidroxi hexanoato-co-3-hidroxi octanoato)

Tabela 4. Possíveis aplicações (adaptado de PHB Industrial, 2012).

Processo	Indústria	Produtos
Extrusão de Chapas	Cartões/Informação	Cartões telefônicos/ crédito/débito
	Embalagens	Berços Termoformados
		Bandejas Termoformadas
		Chapas separadoras
Extrusão de Fibras	Automobilística	Tapetes de automóveis
	Higiene pessoal	Fio dental
	Cigarro	Filtros
Injeção	Veterinária	DLH (dispositivo de liberação hormonal)
		Marcadores (brinco de boi/local)
	Agrícola	Tubeletes para reflorestamento
		Filmes mulching (cobertura e proteção do solo)
	Higiene pessoal	Barbeadores
		Escovas de dente
	Embalagens	Tampas de frascos
		Potes em geral
	Utensílios Domésticos	Diversos
	Brinquedos	Diversos
	Escolar/Escritório	Canetas
		Lápis
		Réguas
Automobilística	Componentes injetados	
	Embalagens	Cartonados
Revestimento de papel		

Tabela 5. Estimativas do mercado atual de PHA e projeção para 2020 de acordo com as empresas Telles e Kaneka (adaptado de Shen *et al.*, 2009).

Setor	% mercado atual		% mercado em 2020	
	Mirel		Mirel	Kaneka
Embalagens	80		20	30
Construção			20	
Agricultura	20		20	14
Textil			10	
Transporte				30
Móveis				
Eletroeletrônica			20	14
Utensílios domésticos				14
Outros			10	

2.1.3 Custo

Embora os PHAs sejam reconhecidos como bons candidatos para substituir os plásticos petroquímicos convencionais, seu alto custo de produção em comparação com os polímeros de base petroquímica é o principal fator que tem restringido a aplicação mais ampla dos PHAs (CHOI e LEE, 1997; LEE *et al.*, 1999; PANDIAN, 2010).

O tipo de substrato, bem como os suplementos fornecidos, as condições de cultivo e o micro-organismo utilizado variam de acordo com a composição polimérica desejada (LEE, 1996a; REHM, 2003; STEINBÜCHEL e EVERSLOH, 2003). Segundo Braunegg *et al.* (2002), as fontes de carbono adequadas para a produção de PHA hoje incluem carboidratos (glicose, frutose e sacarose), alcoóis (metanol e glicerol), alcanos (hexano a dodecano) e ácidos orgânicos (cadeias com 4 carbonos ou mais). As matérias-primas atualmente utilizadas para a produção de PHA são substratos de valor elevado, como sacarose, óleos vegetais e ácidos graxos (SHEN *et al.*, 2009).

Os preços das matérias-primas para a produção de PHA desempenham um papel crucial para a economia do processo. Segundo Choi e Sang (1997), entre 40 % e 48 % do custo total de produção é devido às matérias-primas, sendo que a fonte de carbono seria responsável por 70 % a 80 % dessa despesa total. Braunegg *et al.* (2004) diz que 50 % do custo de produção deriva do custo relacionado à fonte de carbono utilizada.

2.1.4 Poli-3-hidroxi-butirato (P(3HB))

O poli(3-hidroxi-butirato) ou P(3HB), também chamado de poli(β -hidroxi-butirato), é o membro dos PHAs melhor caracterizado, mais estudado e o primeiro a ser descoberto (CHOI e LEE, 1997; POSADA *et al.*, 2011). Sua fórmula química é $(C_4H_6O_2)_n$.

O P(3HB) possui boas propriedades termoplásticas e pode ser processado como os termoplásticos clássicos. Pode ser utilizado em uma ampla faixa de temperatura (mantendo a forma original) de -30 °C a 120 °C (SHEN *et al.*, 2009).

Comparando as propriedades do polipropileno e do P(3HB) percebemos semelhanças entre suas temperaturas de fusão e tensão de cisalhamento (Tabela 3). Contudo, o P(3HB) possui resistência à ruptura muito menor. A adição do monômero 4-hidroxi-butirato (4HB), com formação do copolímero P(3HB-co-4HB), aumenta a resistência à ruptura. As propriedades dos copolímeros de PHA dependem fortemente do tipo, comprimento e a distribuição das unidades de comonômeros na cadeia polimérica (NODA *et al.*, 2004).

O P(3HB) não é tóxico mesmo em concentrações elevadas, sendo assim as formulações de P(3HB) podem ser usadas em produtos que venham a ter contato com a pele, alimentação humana e animal (BIOMER, 2012).

Outra propriedade do P(3HB) é a insolubilidade em água e relativa resistência à degradação hidrolítica. Isso diferencia P(3HB) da maioria dos plásticos biodegradáveis atualmente disponíveis que são sensíveis à umidade ou solúveis em água. Devido ao seu alto grau de cristalinidade (60 % a 70 %), o P(3HB) possui excelente resistência a solventes, além de possuir resistência muito boa a gorduras e óleos. Possui boa resistência a raios UV, porém baixa resistência a ácidos e álcalis. A permeabilidade a oxigênio é muito baixa, tornando o P(3HB) um material adequado para embalar produtos

sensíveis a oxigênio. Além disso, o P(3HB) possui baixa permeabilidade ao vapor d'água quando comparado com outros biopolímeros (SHEN *et al.*, 2009).

A Tabela 6 mostra o potencial de substituição para os copolímeros de PHB, estimados por representantes de Telles e Kaneka. O maior potencial de copolímeros de PHB encontra-se com a substituição PVC, PEAD, PEBD e PP. Em menor grau, da substituição de PET, PBT, PUR e ABS poderia ter lugar (SHEN *et al.*, 2009).

Tabela 6. Potencial técnico de substituição para os PHAs de acordo com Talles e Kaneka (adaptado de Shen *et al.*, 2009).

	++ substituição total				+ substituição parcial			- sem substituição					
	PVC	PEAD	PEBD	PP	PS	PMMA	PA	PET	PBT	PC	POM	PUR	ABS
Mirel ¹	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+
Kaneka ²	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-

¹ Mirel PHA são copolímeros de P(3HB)

² Kaneka PHA são P(3HB-co-HHx)

2.2 Produção de PHA por *Bacillus megaterium*

Chen *et al.* (1991) relataram a produção de P(3HB) por 11 cepas de *Bacillus* selecionadas aleatoriamente a partir da Coleção Alemã de Micro-organismos e Culturas Celulares (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* - DSMZ) e descobriram que todas elas podem sintetizar o P(3HB), embora os teores de P(3HB) contido nas células foram inferiores a 50 % em relação a massa seca.

As bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* possuem características interessantes para aplicações industriais como tolerância a alta temperatura e alta pressão osmótica. Sob condições adequadas apresentam rápido crescimento e são capazes de crescer em diversas fontes baratas de carbono (WU *et al.*, 2001). São bastante empregadas na produção industrial e possuem importância econômica devido às suas enzimas comercialmente importantes, tais como a penicilina amidase (enzima utilizada na produção de antibióticos sintéticos) e as esteroide hidrolases (enzima utilizada para catalisar a hidrólise de uma reação química em esteroides). Além disso, as bactérias do gênero *Bacillus* são os maiores produtores de vitamina B₁₂ por vias aeróbicas (VARY, 1994).

Segundo Braunegg (2004), dependendo da capacidade metabólica dos diferentes micro-organismos, diversas fontes de carbono podem ser utilizadas para produção de PHAs. Alguns micro-organismos produtores de PHAs conseguem metabolizar fontes complexas de carbono, como é o caso da *Bacillus megaterium*.

A *B. megaterium* tem a capacidade de crescer em diversas fontes de carbono (Tabela 7), incluindo resíduos provenientes da indústria de carne e de xaropes de milho, bem como uma grande variedade de açúcares (PRIEST *et al.*, 1988).

Prabhu *et al.* (2010) estudaram o crescimento e acúmulo de PHA por *Bacillus* sp. NQ – 11/A2 identificada como *Bacillus megaterium*, utilizando diferentes fontes de carbono e obtiveram temperatura e pH ótimo para máxima atividade de síntese de PHA foi de 30 °C e 7,0, respectivamente.

Pandian et al. (2010) utilizaram resíduos lácteos como fonte de carbono, farelo de arroz como fonte de nitrogênio e água do mar suprindo sais e micronutrientes e obtiveram satisfatória produção de polímero através da *B. megaterium* SRKP-3.

Prabhu *et al.* (2010) a partir de diversas fontes de carbono como xilose, arabinose, glicose, frutose, galactose, lactose, sacarose, maltose celobiose, trialose, glicerol, manitol entre outros mostraram a capacidade de produção de PHA da *Bacillus sp.* NQ-11/A2 isolada de sedimentos marinhos. Essa cepa mostrou capacidade de não só metabolizar diversas fontes de carbono como também produzir biopolímeros.

Tabela 7. Produção de PHA por *Bacillus sp.* NQ – 11/A2, identificada como *B. megaterium*, utilizando diferentes fontes de carbono (adaptada de Prabhu *et al.*, 2010).

Fonte de carbono	Capacidade de produção de PHAs
Arabinose	+++
Ribose	-
Xilose	++
Glicose	+++
Galactose	+++
Manose	-
Frutose	+++
Ramnose	-
Sorbose	-
Lactose	+++
Sacarose	+++
Maltose	+++
Celobiose	+++
Melibiose	+++
Trealose	+++
Glicerol	+++
Erititol	+++
Adonitol	++
Xilitol	-
Dulcitol	+++
Manitol	+++
Sorbitol	+
Ácido Acético	+
Ácido Glicólico	-
Ácido Pirúvico	+
Ácido Lático	++
Ácido Propiônico	-
Ácido Butírico	-
Ácido Maleico	+
Ácido Tartárico	++
Ácido 3-hidroxibutírico	++
Ácido Succínico	++
Ácido Malônico	++
Ácido Valérico	-
Ácido Cítrico	++

- sem acúmulo de PHA

+, ++, +++ grau de acúmulo de PHA

Segundo Lee *et al.* (1999), um dos problemas que freia a aplicação comercial do P(3HB) é o seu elevado custo de produção, associado ao custo do substrato, principalmente a fonte de carbono. Desta forma, o preço do substrato carbônico tem influência decisiva na economia do processo.

Então, para a produção de PHA atingir viabilidade comercial, bem como para melhorar seu perfil de sustentabilidade, sua produção deve ser proveniente de fontes renováveis baratas. Possibilidades incluem carboidratos (melaço de cana e beterraba, hidrolisados de amido - milho e mandioca, lactose proveniente do soro de leite, hidrolisados de celulose e hemicelulose - resíduos da indústria do papel); alcoóis (resíduos provenientes da produção de biodiesel - metanol mais glicerol, metanol); óleos e gorduras (lipídeos provenientes de resíduos de animais e plantas); ácidos orgânicos (ácido lático proveniente da indústria de laticínios), além de fontes de carbono provenientes de resíduos ou materiais residuais (LEE, 1996b; REHM, 2003; SHEN *et al.*, 2009).

2.3 Efluentes Industriais

Além do baixo preço, a utilização de efluentes industriais como substrato para a produção de P(3HB) se mostra vantajosa devido à produção de produtos de alto valor agregado (LEE *et al.*, 1999). Este ganho se reflete não só ao produtor, mas também reduz os custos associados à disposição desse efluente, bem como o impacto ao meio ambiente, além de promover a reciclagem.

Segundo o Ato de Prevenção à Poluição instituído em 1990 pelo Congresso dos Estados Unidos da América, citado por Comella (1993), a poluição deve ser evitada ou reduzida na fonte sempre que possível. Quando não há viabilidade de aplicação desta alternativa, devem ser considerados e utilizados a reciclagem, o tratamento e, em último caso, a disposição final de resíduos. A reciclagem consiste no uso ou reuso de resíduos como um substituto efetivo para um produto comercial ou como um ingrediente de matéria-prima em um processo industrial. Inclui a recuperação de frações úteis de constituintes ou a remoção de contaminantes de um resíduo para que este possa ser utilizado. Reciclagem pode ocorrer no local de geração ou fora dele (COMELLA, 1993).

Um dos efluentes que tem se mostrado atrativo para uso como fonte de carbono é o resíduo da indústria de laticínios, devido ao seu baixo custo e grande disponibilidade (PANDIAN *et al.*, 2010). Segundo Lee *et al.* (1999) o soro de leite é o subproduto principal da indústria de fabricação de queijos, representando entre 80 % e 90 % do volume de leite transformado. A lactose é o principal componente do soro de leite (e do permeado de soro) e muitos micro-organismos podem utilizar lactose para o seu crescimento. Estudos mostram que o preço de lactose a partir de soro de leite pode ser estimado em \$ 116,7 t⁻¹, sendo que glicose pura, que é um substrato comum para fins biotecnológicos chega a \$ 493 t⁻¹ (KOLLER *et al.*, 2005).

O permeado de leite pode ser obtido através da passagem do soro de leite por uma membrana de ultrafiltração que promove a retenção seletiva de proteínas e outros materiais coloidais, retenção parcial de compostos nitrogenados mais simples e materiais com uma massa molar da ordem de 5.000 Daltons, utilizando uma pressão relativamente baixa, de 1 a 7 bar. A água e os solutos de baixa massa molar, como lactose, sais

minerais, aminoácidos livres, ácido láctico e algumas vitaminas, passam através da membrana (HOFFMANN, 2003). O permeado é um produto estéril, isento de gordura e apresenta apenas traços de proteínas (na verdade material nitrogenado, uma vez que é medido o nitrogênio total). Sua composição é, basicamente, lactose e/ou xarope glicosado (JULIANO *et al.*, 1987).

Resíduos da indústria de laticínios possuem alta DBO e DQO, não podendo ser descartado na natureza (ORHON *et al.*, 1993). Além disso, a sua eliminação está associada a um custo considerável (PANDIAN *et al.*, 2010).

Cálculo de rendimento teórico mostra que 5×10^7 t de soro de leite produzidos anualmente na Europa poderiam ser usados para produzir $6,18 \times 10^5$ t de P(HB-co-15%HV) (BRAUNEGG *et al.*, 2002).

Outro resíduo que tem se mostrado atrativo é o glicerol, proveniente da indústria do biodiesel. Isto porque a crescente produção de biodiesel tem gerado um excedente de glicerol e, conseqüentemente, uma queda no seu preço de venda (POSADA *et al.*, 2011). Em toda a Europa, o total de produção de biodiesel estimada em $1,925 \times 10^6$ t em 2005 e $2,649 \times 10^6$ t em 2008, correspondendo a $1,925 \times 10^5$ t e $2,649 \times 10^5$ t de glicerol, respectivamente (KOLLER *et al.*, 2005).

Segundo Posada *et al.* (2011), a percentagem mais elevada para o custo global de produção de PHB é o custo do substrato, em torno de 45 %. Entretanto, se o glicerol é utilizado como matéria-prima esta percentagem é inferior a 8 %.

3 Materiais e Métodos

Os experimentos deste estudo foram realizados no Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS). No presente trabalho, avaliou-se o crescimento e produção de biopolímero pela bactéria *B. megaterium* utilizando-se diferentes fontes de carbono. Para isto, realizou-se um cultivo de 48 h em batelada em estufa incubadora rotatória. Todos os testes foram realizados em duplicata. Foram obtidas amostras nos tempos de 24 h e 48 h, uma vez que as amostragens são destrutivas e a estufa possui um número limitado de garras para comportar os frascos de cultivo. Os testes foram realizados conforme descrito a seguir.

3.1 Cultivo do micro-organismo

3.1.1 Ativação celular e inóculo

O micro-organismo empregado foi *Bacillus megaterium* DSMZ 32^T. As células foram mantidas a -18 °C em solução crioprotetora (20 % em volume de glicerol).

Para a reativação celular a fim do seu emprego como inóculo no biorreator, realizou-se o cultivo das células em frascos cônicos contendo meio mineral, conforme descrito em

Wang e Lee (1997), acrescido de $16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose e $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sulfato de amônio. Na Tabela 8 é apresentada a composição do meio mineral, bem como detalha a composição da solução de micronutrientes utilizada.

Os frascos de pré-inóculo foram mantidos durante 16 h em estufa incubadora rotatória a 140 rpm e temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Após este período foi adicionado ao cultivo, em cada experimento, 2 % desse inóculo em relação ao volume do meio de cultivo.

Tabela 8. Composição do meio mineral e solução de micronutrientes

Meio Mineral	
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
Solução de Micronutrientes	
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

3.1.2 Fontes de Carbono

Experimentos foram realizados com a finalidade de avaliar a produção de P(3HB) e biomassa utilizando diferentes fontes de carbono.

Foram utilizados como fonte de carbono efluente indústria do biodiesel, efluente indústria de laticínios (soro de leite e permeado de leite) e efluente da indústria de soja. Faccin (2007) em seu trabalho verificou a razão carbono/nitrogênio mais adequada para a produção de P(3HB) por *B. megaterium*, utilizando sacarose como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Essa razão foi utilizada para os cálculos de concentração das fontes de carbono. Sendo assim, a concentração empregada de cada efluente foi tal que garantisse a mesma concentração de carbono presente em $16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose. Quando necessário, o pH inicial foi ajustado para 7,0.

Os experimentos foram realizados em estufa incubadora rotatória, em frascos cônicos de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo, com temperatura e agitação controlados em $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 140 rpm, respectivamente.

Os dados de biomassa e acúmulo de polímero apresentados foram obtidos no tempo de 24 h e 48 h de cultivo.

- Efluente da indústria do biodiesel:

A Tabela 9 apresenta a composição do efluente da indústria de biodiesel (laudo encontra-se no Anexo A). Foi considerada uma concentração de 80 % de glicerol no efluente, então, para suprir a quantidade de carbono presente em $16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) foi utilizado $21,52 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$). Este efluente também foi suplementado com meio mineral (Tabela 8) e $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sulfato de amônio.

Tabela 9. Composição do efluente da indústria do biodiesel.

Glicerol	81,780 %
Cinzas	5,820 %
Cloretos	6,000 %

- Efluente da indústria de laticínio:

Provenientes da indústria de laticínio foram utilizados como fonte de carbono o soro e o permeado de leite.

A composição do soro é variável e pode ser afetada pela variedade de queijo produzido, além do tratamento térmico do leite, manipulação e outros fatores (CHEEKE *et al.*, 1973; SCHINGOETHE *et al.*, 1980). A composição típica do soro e dos produtos obtidos da ultrafiltração é apresentada na Tabela 10.

Tabela 10. Composição típica do soro e permeado de leite obtido através de ultrafiltração – fator de concentração igual a 5 (volume/volume) (adaptado de HOFFMANN, 2003).

Produto	Constituintes (%)				
	Proteínas	Lactose	Gordura	Sais	Proteína/Lactose
Soro	0,9	4,9	0,3	0,6	0,18
Permeado	0,1	5,0	0,0	0,5	0,02

- Efluente da indústria de soja:

O efluente da indústria de soja foi obtido do resíduo intermediário do processo secundário de tratamento de efluente de uma indústria de produção de proteínas isoladas de soja, proteínas texturizadas e concentradas de soja, lecitinas e fibras de soja.

Segundo Cassini (2008), o efluente gerado na produção de isolados proteicos a base de soja é composto, basicamente, por proteínas e carboidratos solúveis em meio aquoso, atingindo elevados valores de DQO, além de altos teores de nitrogênio. A composição típica desse efluente encontra-se na Tabela 11.

Tabela 11. Composição típica do efluente de uma indústria de produção de isolados proteicos a base de soja (adaptado de Salvadori *et al.*, 2012).

Parâmetro	Composição (mg·L ⁻¹)
DQO	17.000
Teor proteico	4.200
Sólidos Suspensos Totais	3.800
Sólidos Totais	18.000

O efluente foi esterilizado utilizando filtração com membrana de 0,22 µm e o pH foi corrigido de 3,91 para 7,06.

3.2 Análises

3.2.1 Biomassa

A determinação da biomassa total foi feita através de medidas de massa seca celular (gravimetria). A massa de cada frasco vazio foi medida previamente. Amostras em duplicata (10 mL) foram coletadas dos cultivos após 24 h e 48 h, centrifugadas durante 15 min a 3500 rpm. Os sobrenadantes foram retirados e reservados e os precipitados foram lavados com água destilada e novamente centrifugadas nas mesmas condições e então colocados em estufa até atingirem massa constante. O valor de biomassa total é correspondente ao valor pesado contendo células mais polímero menos o valor do frasco vazio, considerando o volume coletado. A biomassa foi obtida da seguinte maneira:

$$X = \frac{M - m}{V_a} \quad (1)$$

onde M é a massa do frasco com a massa celular seca; m é a massa de cada frasco e V_a é o volume coletado de meio em cada frasco centrifugado.

3.2.1 Poli(3-hidroxibutirato)

A quantidade de P(3HB) foi determinada através do método descrito por Riis e Mai (1988). O método consiste na quebra do polímero por meio de propanólise com subsequente quantificação utilizando cromatografia gasosa. Pesou-se as células secas em um frasco e posteriormente foi adicionado 2 mL de 1,2-dicloroetano, 2 mL de n-propanol acidificado (4 partes de n-propanol para 1 parte de ácido clorídrico) e 2 µL de solução de padrão interno, composto por 2 g de ácido benzóico em 50 mL de n-propanol. O frasco, hermeticamente fechado, foi então colocado em banho a 100 °C por 2,5 h com agitação intermitente a cada 30 min. Posteriormente, ele foi resfriado até atingir a temperatura ambiente, foram adicionados 4 mL de água destilada e submetido a agitação em vortex. Da fase orgânica resultante (mais densa) é obtido o cromatograma. A Figura 5 mostra a curva de calibração que foi construída a fim de correlacionar-se as áreas de massas conhecidas de P(3HB) padrão (Sigma-Aldrich) com a área do padrão interno. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso da marca Perkin Elmer, com detector de ionização de chama com uma coluna capilar PE-WAX 30 m × 0,25 mm.

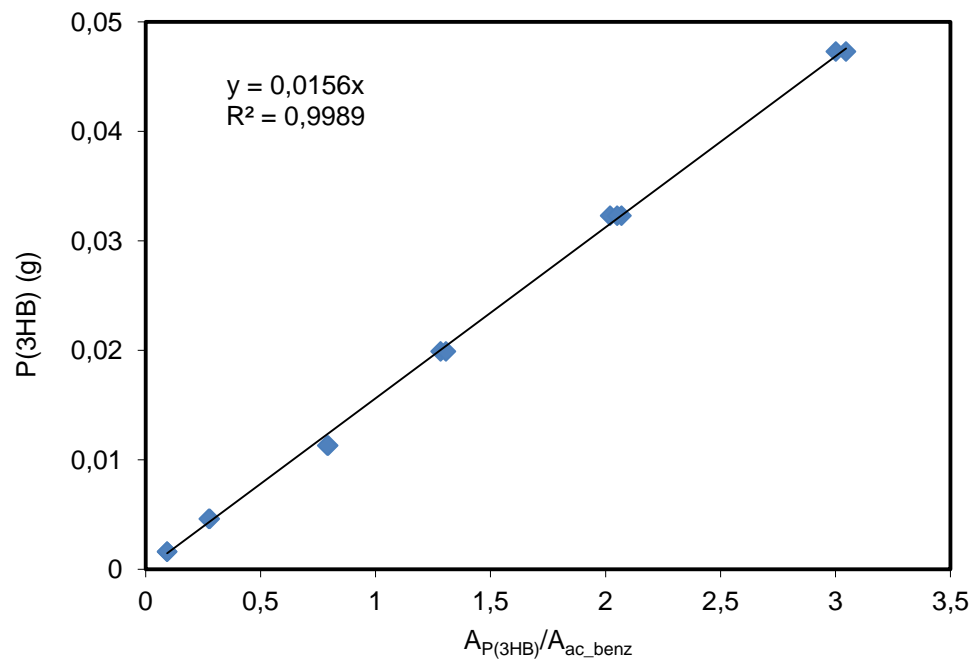


Figura 5. Curva de calibração com P(3HB) padrão (Sigma-Aldrich).

Com o valor obtido em gramas de polímero e células totais, calcula-se a percentagem de polímero acumulado na célula da seguinte maneira:

$$\%PHB = \frac{PHB}{X} \times 100 \quad (2)$$

4 Resultados e Discussão

4.1 Crescimento celular

O crescimento celular durante o cultivo foi analisado através das curvas de biomassa em função do tempo de cultivo para os diferentes substratos, mostradas na Figura 6. Para obter a curva típica de crescimento, os valores de biomassa foram plotados em escala logarítmica.

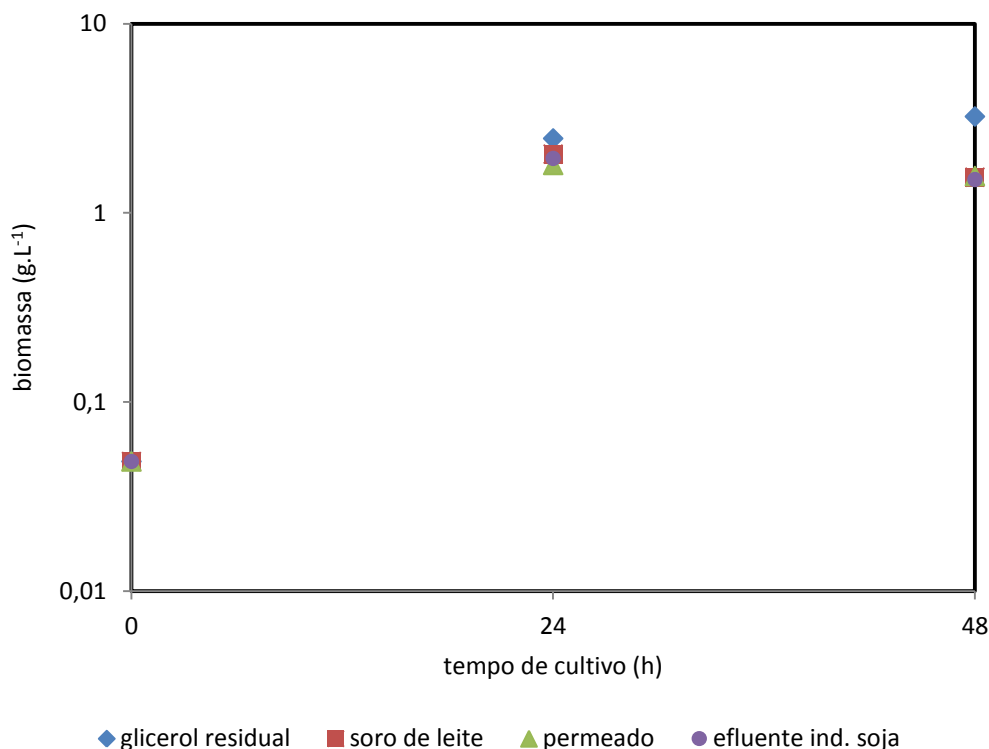


Figura 6. Curva de crescimento celular de *B. megaterium* para o cultivo com as diferentes fontes de carbono.

Ao longo das 48 h, percebeu-se a alteração no aspecto visual do cultivo, de transparente para turvo. Também foi notado um odor característico.

Devido ao espaçamento entre os pontos, não foi possível verificar a fase *lag* de adaptação das células.

Para as amostras cultivadas com os efluentes da indústria de laticínios (soro e permeado), bem como com o efluente da indústria de soja, verifica-se um leve decréscimo na concentração de biomassa no meio entre 24 h e 48 h de cultivo. Cabe salientar que para estes efluentes descritos acima não foi feito nenhum tipo de suplementação de micronutrientes e nem adição de fonte de nitrogênio como foi empregado para o glicerol residual.

Já para a amostra cultivada com o efluente da indústria de biodiesel (glicerol residual), percebe-se um aumento da concentração de biomassa no meio, indicando crescimento celular neste mesmo intervalo de tempo.

4.2 Produção de polímero

A concentração de polímero bem como sua proporção foi analisada através das curvas de concentração de polímero em função do tempo de cultivo para os diferentes substratos, obtidas através de análise das amostras em cromatógrafo gasoso.

A Figura 7 denota a concentração de polímero, utilizando as diferentes fontes de carbono, ao longo de 48 h. A *B. megaterium* apresentou acúmulo de polímero em todos os substratos empregados no presente estudo, evidenciando potencial para produção nestes efluentes testados.

Assim como para o gráfico de crescimento de biomassa, nas amostras cultivadas com os efluentes da indústria de laticínios (soro e permeado), bem como com o efluente da indústria de soja, verifica-se um decréscimo na concentração de polímero no meio, indicando que houve consumo do mesmo. O consumo pode ter sido ocasionado por limitação de algum micronutriente ou mesmo por limitação de fonte de nitrogênio.

Já para a amostra cultivada com o efluente da indústria de biodiesel (glicerol residual), percebe-se um aumento da concentração de polímero no meio. Devido ao espaçamento entre os pontos, não é possível concluir se após essas 48 h a concentração de polímero continuaria aumentando ou se o último ponto do gráfico já evidencia uma queda da concentração de polímero em que o pico se encontra entre 24 h e 48 h. Cabe ressaltar que foi utilizado glicerol residual oriundo da produção de biodiesel sem nenhuma purificação posterior.

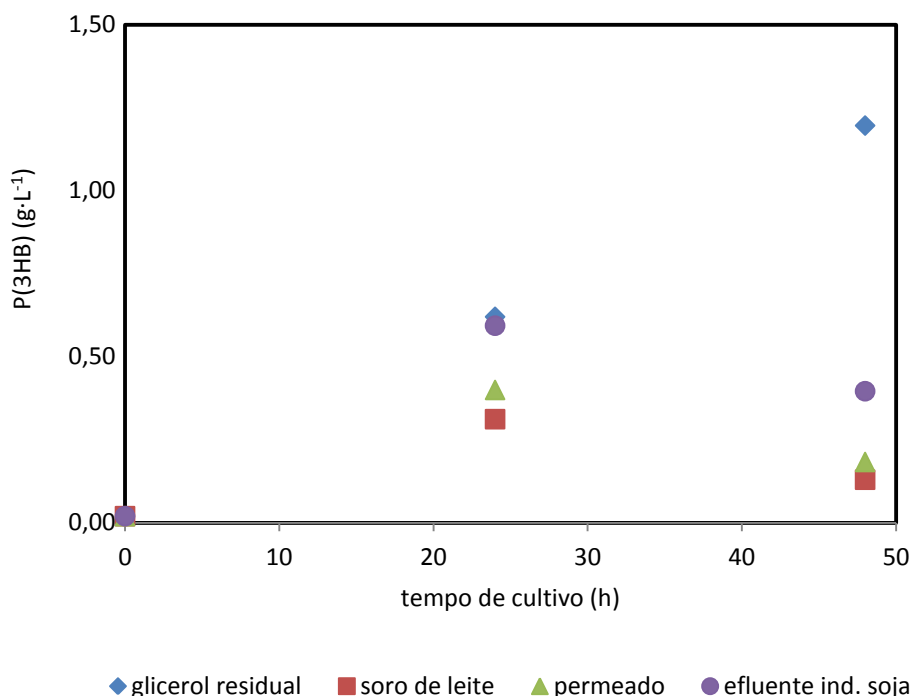


Figura 7. Curva de concentração de polímero no meio para o cultivo com as diferentes fontes de carbono.

Tabela 12. Acúmulo de polímero pela *B. megaterium* nas amostras após 24 e 48 h para as diferentes fontes de carbono.

Fonte de carbono	24 h	48 h
Glicerol residual	25 % ± 3 %	37 % ± 3 %
Soro de leite	15 % ± 1 %	5 % ± 1 %
Permeado de leite	22 % ± 2 %	18 % ± 3 %
Efluente indústria de soja	30 % ± 4 %	22 % ± 1 %

Utilizando soro de leite como fonte de carbono, Kim *et al.* (1992) avaliaram a produção de PHB por *Escherichia coli* recombinante em testes com e sem limitação de oxigênio. Na cultura com limitação de oxigênio obteve-se 80 % de PHB com produtividade de 0,48 g·L⁻¹·h⁻¹, enquanto na cultura sem limitação obteve-se 57% de PHB com produtividade de 0,9 g·L⁻¹·h⁻¹. Embora a *E. coli* não necessite de limitação de nutriente para produzir o polímero, na condição de oxigênio insuficiente houve aumento da produção de PHB, por diminuição da velocidade de crescimento celular.

Wang e Lee (1998) estudaram a produção de PHB utilizando soro de leite concentrado como fonte de carbono em culturas de alta densidade de células de *Escherichia coli* recombinante, em batelada alimentada. A *Escherichia coli*, assim como a *Bacillus megaterium*, não necessita limitação de nutrientes e a síntese de PHAs ocorre ainda na fase de crescimento celular. Os autores obtiveram total de 80 % de polímero. Apesar de terem obtido valores de concentração e produtividade de polímero menores do que aquelas obtidas com fontes puras de carbono, relataram que sua produção pode ser econômica principalmente se incorporada a uma indústria de laticínios, agregando valor ao efluente. Contudo, naturalmente a *E. coli* não é produtora de P(3HB) e a utilização de micro-organismos recombinantes requer cuidados adicionais para que não haja perda da habilidade obtida por modificação genética.

Posada *et al.* (2011) realizaram uma análise técnico-econômica para a produção de PHB a partir de glicerol bruto. O processo foi realizado utilizando duas qualidades de glicerol, 88 % e 98 % em peso, utilizando *Cupriavidus necator* JMP 134. Os resultados da avaliação econômica demonstraram que o regime tecnológico mais apropriado requer purificação do glicerol bruto em até 98 % em peso. Isto porque a maior produção de PHB reduz os custos de utilidades no processo à jusante. Uma composição típica de glicerol bruto num processo de produção de biodiesel é: metanol 32,59 % em peso, glicerol 60,05 % em peso, NaOCH₃ 2,62 % em peso, gorduras 1,94 % em peso e cinzas 2,8 % em peso. Os autores iniciaram o processo com a purificação do glicerol bruto, obtendo 99,9 % de pureza utilizando o processo de evaporação. O processo segue com o tratamento de impurezas e evaporação da água e a corrente contendo 80,5 % em peso de glicerol é destilada sob duas condições de operação diferentes para obter glicerol a 88 % e 98 % em peso. Os autores testaram três processos a jusante do cultivo para extração do PHB. Eles obtiveram 37,7 %, 38,0 % e 25,2 % de acúmulo de PHB utilizando o glicerol a 88 % em peso. Já para o processo utilizando glicerol a 98 % foram obtidos 53 %, 41,7 % e 37,2 % de PHB.

Vale lembrar que no cultivo realizado no presente trabalho com glicerol residual oriundo da produção de biodiesel nenhum tipo de purificação posterior foi realizada e, apesar disto, foram obtidas quantidades de polímero próximas àquelas descritas por

Posada *et al.* ao trabalhar com glicerol a 88 % em peso. Isto demonstra que há potencial para aprimorar o processo e obter valores ainda maiores de produção de polímero.

Cavalheiro *et al.* (2009) também utilizaram a bactéria *Cupriavidus necator* DSM 545 para avaliar a produção de P(3HB) utilizando glicerol residual como substrato (glicerol comercial foi utilizado como substrato controle). O glicerol residual foi obtido de uma planta piloto portuguesa de produção de biodiesel através do refino de óleos vegetais utilizando metóxido de sódio como catalisador, contendo, em peso, 3 % de Na⁺, menos de 0,2 % de metanol e menos de 1,5 % de monoacilglicerídeos. Utilizando o glicerol residual eles obtiveram 38 % de acúmulo de P(3HB), enquanto que para o glicerol comercial este valor chegou em 62 %. A concentração celular máxima foi obtida em 30,5 h, com 38 % de P(3HB). Os autores verificaram que, em ambos os testes, com glicerol residual e glicerol comercial, pequenas quantidades de P(3HB) foram produzidas antes da depleção do nitrogênio, sendo que, após a redução de nitrogênio no meio, houve um aumento de nove vezes na taxa de produção de P(3HB) durante aproximadamente 4,5 h, quando a taxa começou a diminuir, atingindo um patamar de concentração de P(3HB) entre 30,5 h e 44,5 h. A *Cupriavidus necator* pertence ao grupo de bactérias que necessita de limitação de algum nutriente essencial como N, P, Mg, K, O ou S e excesso de fonte de carbono para que haja síntese de PHAs (POSADA *et al.*, 2011). Cavalheiro *et al.* (2009) verificaram que utilizando o glicerol residual, houve lise celular durante o período de produção, verificado através do decréscimo do peso seco de células residuais. Ao diminuir a concentração de biomassa no meio, houve um aumento de produtividade e a quantidade de polímero produzida chegou em 50 % do peso seco de biomassa. As taxas médias de consumo específico durante as fases de crescimento e produção observadas foram semelhantes em ambos os cultivos, sendo esta maior durante a fase de crescimento. Apesar de apresentarem taxas de produção de P(3HB) muito próximas, utilizando-se o glicerol comercial foi obtido o maior valor de produtividade de P(3HB). Isto basicamente resultou do fato de que o período de produção ativa de P(3HB) foi maior no caso do glicerol comercial (7,5 h contra 4,5 h). Uma explicação possível para a redução do tempo de produção com o glicerol residual é a presença de uma quantidade substancial de Na⁺ no meio. No entanto os autores não souberam explicar por que a produção cessa após 7,5 h utilizando-se o glicerol comercial.

Apesar da *B. megaterium* pertencer ao grupo de micro-organismos que não necessita a limitação de algum nutriente essencial para que haja a síntese de PHAs, esta mostrou quantidade de acúmulo de polímero, utilizando-se glicerol residual, próxima àquela obtida com a *C. necator* por Cavalheiro *et al.* (2009). Os autores obtiveram concentração celular máxima após 30,5 h de cultivo. No experimento apresentado no presente trabalho, não foi possível inferir após quantas horas de cultivo obteve-se a concentração máxima, nem mesmo se a concentração máxima foi atingida, devido ao espaçamento entre os pontos e o término do cultivo após 48h.

López *et al.* (2012) estudaram a capacidade de produção de polihidroxibutirato (PHB) através da implementação de diferentes configurações em meios formulados de uma nova cepa de *B. megaterium*. O principal objetivo dos autores era identificar o efeito das condições limitantes no crescimento de *B. megaterium* BBST4 e produção de biopolímeros utilizando glicose e glicerol, separadamente, como fonte de carbono. Variando apenas o substrato carbônico e mantendo as mesmas condições de trabalho, eles obtiveram resultados muito próximos de concentração de biomassa e acúmulo de polímero, sendo que a única diferença significativa entre os testes foi o tempo de duração

da cultura inteira, sendo maior no experimento com glicerol. Segundo os autores, isto poderia ser atribuído à dificuldade da *B. megaterium* em metabolizar rapidamente o glicerol como única fonte de carbono. Este resultado pode justificar, neste trabalho, o fato da concentração de polímero continuar crescendo mesmo após 48 h de cultivo no experimento conduzido com glicerol residual.

Os autores também observaram o crescimento e produção de PHB utilizando condições limitantes, no caso maior concentração de carbono em relação ao nitrogênio, e observaram maiores concentrações de biomassa, porém menor fração mássica de PHB. Estes resultados também foram obtidos por Kulpreecha *et al.* (2009), que relatou 62 % de PHB intracelular, em comparação com uma produção de 42 % durante a operação em condições limitantes usando *B. megaterium* BA-019 em melaço de cana de açúcar. Segundo López *et al.* (2012), estas condições limitantes possuem as mesmas características nutricionais que estimulam a geração de esporos em micro-organismos gram-positivos.

Vale lembrar que o cultivo realizado com glicerol residual foi o único efluente que foi suplementado com meio mineral e sulfato de amônio. Pela Tabela 10 percebemos que a quantidade de proteínas (fonte de nitrogênio) contida no soro de leite e no permeado é bem menor do que a resultante no cultivo realizado com o glicerol residual. Talvez este fator limitante explique o decréscimo da concentração de biomassa bem como da concentração de P(3HB) verificados nos experimentos utilizando efluente da indústria de laticínio (soro e permeado) e efluente da indústria de soja, pois quando as fontes nutricionais se tornam escassas, a célula é capaz de quebrar o polímero para produzir energia, desse modo prolongando sua existência e suprindo suficientemente sua alimentação normal (KEMMISH, 1993).

Koller *et al.* (2008) observaram crescimento bacteriano e produção de PHA pela *Pseudomonas hydrogenovora* DSM 1749 utilizando um meio sintético com açúcares puros (glicose e galactose) e o permeado de soro de leite contendo excesso de cerca de 20 % em peso de lactose, separadamente. Eles verificaram que, comparada com a cultura em meio sintético com glicose e galactose, houve um maior crescimento de biomassa no meio contendo o permeado de soro. A síntese de PHB foi interrompida após a depleção de açúcar no permeado de soro, porém não foi verificada degradação de PHB. Já meio sintético com glicose e galactose o PHB foi degradado após a depleção dos açúcares. Segundo os autores isto pode ser causado por pequenas quantidades de fontes de carbono adicionais e os outros componentes de crescimento presentes naturalmente no permeado de soro. Para as células cultivadas em permeado de soro de leite a síntese de PHB foi prolongada. Isto é possivelmente devido a outras fontes naturais de carbono disponíveis do meio complexo. Portanto, uma maior concentração final de PHB foi observada em comparação com a experiência realizada sem o permeado de soro. Resultados anteriores conduzem à conclusão de que, em comparação com os açúcares puros como substratos de carbono, impactos positivos sobre o crescimento foram observados quando o permeado de soro é aplicado como fonte de carbono para a produção de PHB. Conforme o resultado obtido pelos autores, a utilização do permeado de soro de leite como substrato para produção do PHB se mostra vantajosa, não só pelo aproveitamento e reciclagem do efluente, mas também devido a maior concentração final de PHB obtida em comparação com o uso de açúcares puros.

4.3 pH

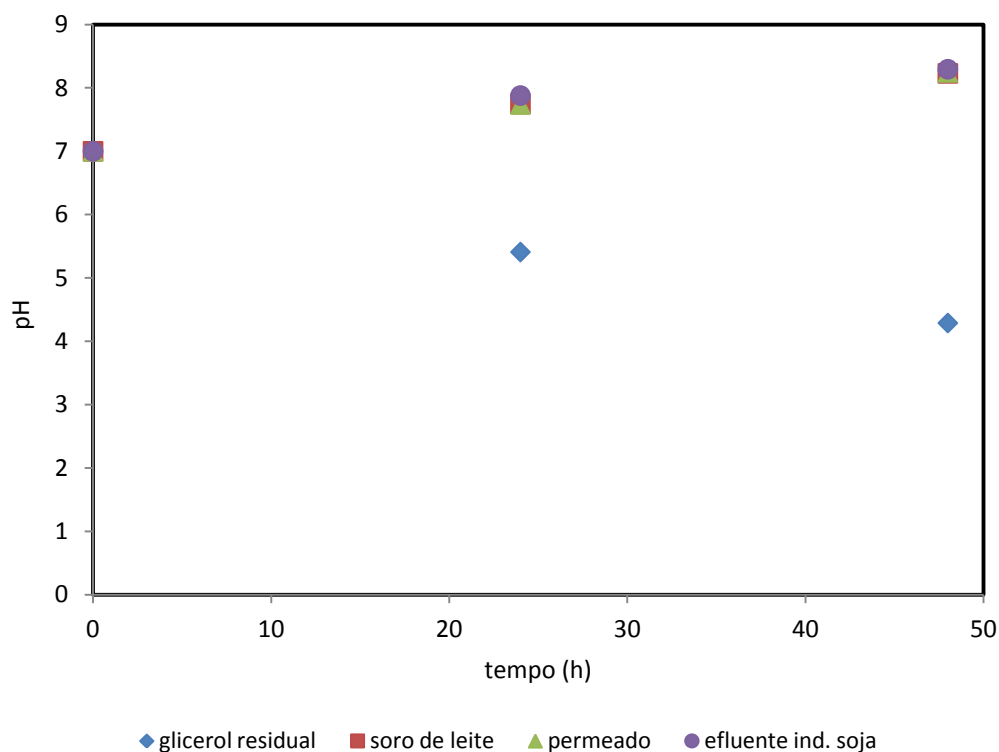


Figura 8. Variação do pH do meio para os cultivos pela *B. megaterium* utilizando diferentes fontes de carbono.

Com base nos valores de pH obtido para os cultivos, percebe-se uma acentuada queda no pH do meio utilizando-se glicerol residual. Para as outras fontes de carbono utilizadas, verifica-se um expressivo aumento no pH do meio.

Koller *et al.* (2008) verificaram que, quando o micro-organismo foi cultivado em meio sintético com açúcares puros, um alto decréscimo do valor do pH foi observado. Já no experimento utilizando permeado de soro de leite sob as mesmas condições anteriores, o valor do pH permaneceu constante, enquanto que as concentrações dos ácidos orgânicos excretadas foram mais ou menos as mesmas. A razão para isso pode ser uma elevada capacidade tampão natural de soro de leite em si.

Este fato não foi observado no experimento do trabalho em questão em que, utilizando-se o efluente da indústria de laticínio (soro e permeado de leite) o pH apresentou incremento considerável (Figura 8).

Beaulieu *et al.* (1995) verificaram a influência de sais de amônio e melaço de cana sobre o crescimento de *Alcaligenes eutrophus* e produção de polihidroxibutirato e verificaram queda do pH do meio de cultura devido a produção de H_2SO_4 quando o íon de amônio a partir do $(NH_4)_2SO_4$ foi assimilado pelas bactérias.

Isto pode explicar a queda do pH do meio na cultura utilizando glicerol residual, uma vez que esta foi suplementada com sulfato de amônio $((NH_4)_2SO_4)$.

A influência do pH do meio também foi verificada por Valappil *et al.* (2007b) em cultivos com *Bacillus cereus* SPV. Eles obtiveram a maior produção de P(3HB) durante a fase de crescimento estacionária, 72 h de cultivo, sem degradação do polímero mesmo após 120 h de cultivo. A partir de 70 h de cultivo o pH atingiu um valor baixo (4,5) e segundo os autores, o valor baixo de pH estaria relacionado ao não consumo de polímero. Kominek e Halvorson (1965) também obtiveram esse resultado trabalhando com *B. cereus* e verificaram que o metabolismo do P(3HB) é afetado pela concentração de íons hidrogênio. Quando o meio de cultivo foi mantido num valor mais alto de pH, a produção de P(3HB) não foi favorecida, enquanto que num pH baixo, o consumo do polímero foi suprimido e a formação de esporo foi inibida.

Philip *et al.* (2009) investigaram a influência da rotação e pH do meio de cultura na produção de P(3HB) também por *Bacillus cereus* SPV. Para testar a influencia do pH, os autores realizaram experimentos com controle de pH nos valores de 3,0; 6,8 e 10,0. O cultivo que apresentou maior produção foi com pH controlado em 6,8, atingindo 23 % de P(3HB) em 25 horas com posterior consumo de polímero, valor menor do que o obtido no experimento sem controle de pH. Nos experimentos sem controle de pH, o pH caiu para um valor de 4,5 e não houve degradação do polímero produzido. Segundo os autores, isto é possivelmente devido ao fato de que a degradação do P(3HB) leva à produção de 3-hidroxibutirato, um ácido, portanto, pela lei da ação das massas, em condições de baixo pH a degradação do polímero é inibida. A queda do pH ocorre, possivelmente devido à produção de ácido acético, ácido láctico e ácido pirúvico. Os autores sugerem que o baixo valor de pH inibe a degradação interna do P(3HB).

Desta forma, a queda do pH observada no presente trabalho pode ter evitado o consumo intracelular do polímero no meio com glicerol. Nos meios com efluente da indústria de laticínio e efluente da indústria de soja o pH aumentou consideravelmente e, juntamente a isso, houve queda da concentração de polímero no meio (Figura 7). Este decréscimo na concentração de polímero pode ser justificado pelo consumo intracelular deste polímero, normalmente atribuído à formação de esporo, levando a níveis de acúmulo de polímero baixo.

4.4 Co-polímero

Pela análise do cromatograma obtido para o cultivo com permeado de soro de leite, verificou-se um pequeno pico entre os picos do 3HB e do ácido benzoico. Na Figura 9 está representado um zoom onde se evidencia apenas o pico do 3HB e o outro pico de massa molar intermediária. Este pico está localizado no tempo de retenção referente ao 3HV, indicando que pode ter havido a formação de co-polímero utilizando-se permeado de soro de leite como fonte de carbono.

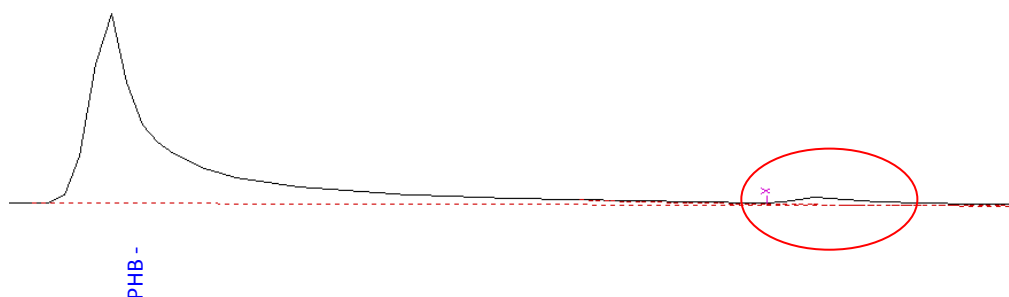


Figura 9. Cromatograma obtido pela análise da amostra cultivada com permeado de soro de leite.

Koller *et al.* (2005) avaliaram a produção de PHA por uma cepa de bactéria silvestre osmofílica (que requerem um meio com alta pressão osmótica, crescem em altas concentrações de açúcares) que, segundo os autores, ainda está sob a caracterização detalhada. Eles utilizaram como substrato permeado de soro de leite hidrolisado obtido de uma empresa de laticínios com concentração de lactose de 20 % (w/v), que constitui o limite superior de solubilidade da lactose em água, e glicerol a partir da produção de biodiesel a partir de óleos vegetais, contendo cerca de 70 % (w/w) de glicerol. No fim do cultivo com permeado de soro de leite hidrolisado, foi obtido um teor máximo de PHA na biomassa seca de 50 %. Além disso, os autores observaram que o micro-organismo investigado possui a propriedade de produzir unidades de 3-hidroxicvalerato (3HV) diretamente a partir de hexoses. Normalmente, a produção biotecnológica de 3HV exige a presença de precursores (ácido propiônico, ácido valérico), que contribuem significativamente nos custos de produção. Durante a fase de produção, a proporção de 3HV no polímero manteve-se a um nível constante entre 8 e 10 % (w/w). A composição do polímero e as unidades de 3-HV (8 % a 10 % de 3-HV/PHA) produzido a partir do glicerol residual foram semelhantes aos de açúcares de soro de leite, sem suplementação de precursores. Porém os autores verificaram formação de polímero com peso molecular significativamente mais baixo em comparação com o polímero produzido a partir de soro de leite, o que, segundo eles, correspondem com os resultados obtidos na literatura, onde tem sido demonstrado que os pesos moleculares diminuem quando o glicerol ou glicóis estão presentes no meio. Estas substâncias causam terminação da propagação da cadeia por ligação covalente ao terminal carboxil do PHA. Os rendimentos calculados foram semelhantes em ambos os testes, obtendo 33 % na relação PHA/açúcares do soro de leite e 23 % na relação PHA/glicerol.

Ahn *et al.* (2000) avaliaram o crescimento de *Ralstonia eutropha* em lactose hidrolisada e em soro de leite. Quando o soro de leite foi utilizado como única fonte inicial de carbono, com adições de açúcar invertido e ácido propiônico na forma de pulsos, observou-se uma fase de crescimento exponencial, com velocidade específica máxima de $0,23 \text{ h}^{-1}$, bastante similar aos resultados com *R. eutropha* crescendo em outros substratos, como glicose e açúcar invertido. Apesar de ter produzido pouco conteúdo de polímero, em torno de 37 %, a fração de unidades 3HV foi bastante elevada, 38 %. Estes resultados sugerem a possibilidade da existência de precursores de 3HV no soro de leite e mostram que o soro de leite é uma alternativa interessante para a produção de PHAs, com composição atrativa comercialmente.

Reddy *et al.* (2009b) observaram a produção do copolímero poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) [P(3HB-co-3HV)] a partir de uma única fonte de carbono, glicose e glicerol, separadamente. A bactéria utilizada, designada como 88D, foi isolada a partir de uma estação municipal de tratamento de esgoto em Hyderabad, Índia. Segundo os autores, com base nas características fenotípicas e investigações genotípicas, este micro-organismo foi identificado como *Bacillus sp.* Utilizando ambos os substratos a *Bacillus sp.* 88D produziu P(3HB-co-3HV). No meio contendo apenas glicose como fonte de carbono a cepa produziu 64,62 % de polímero, sendo que deste polímero 96 % era do monômero 3HB e 4 % do monômero 3HV. No meio contendo apenas glicerol houve uma produção de 60,46 % de polímero, sendo 85 % do monômero 3HB e 15 % do monômero 3HV.

Pela análise do cromatograma obtido para o cultivo com glicerol residual também se verifica um pequeno pico entre os picos do 3HB e do ácido benzoico (Figura 10). Porém este pico está localizado no tempo de retenção superior àquele referente ao 3HV, indicando que pode ter havido a formação de um co-polímero com massa molar maior que do 3HV (5 carbonos), podendo representar o 3HHx (3-hidroxi-hexanoato) que possui 6 carbonos na unidade subunidade (monômero). Não foi possível a verificação do tempo correspondente ao monômero, pois só havia padrões de 3HB e 3HV.

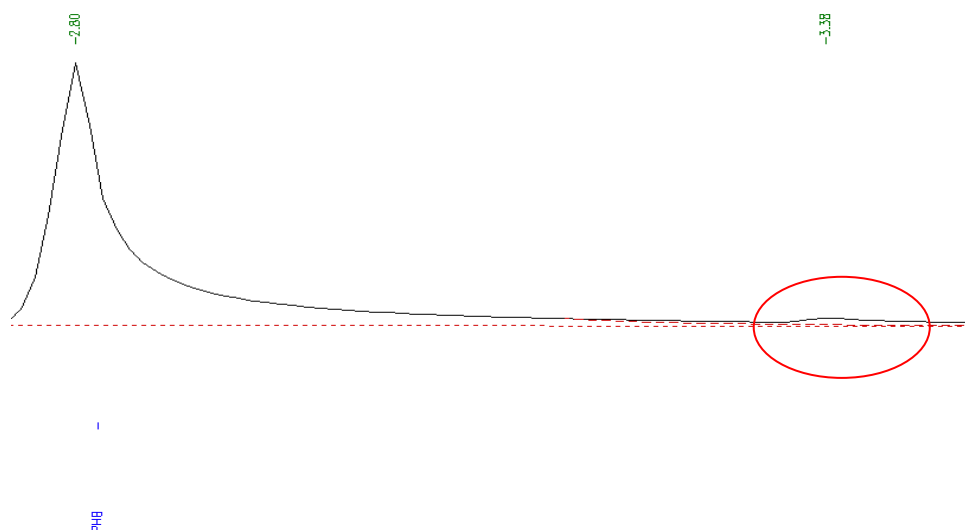


Figura 10. Cromatograma obtido pela análise da amostra cultivada com glicerol residual.

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

Neste trabalho, realizou-se cultivo batelada de *B. megaterium* durante 48 h em estufa incubadora rotatória. Foram determinados periodicamente valores de pH, biomassa e polímero. Nas amostras cultivadas com os efluentes da indústria de laticínios (soro e permeado de leite), bem como com o efluente da indústria de soja, foi observado um leve decréscimo na concentração de biomassa no meio durante o experimento. Igualmente, a concentração de polímero no meio diminuiu, indicando que houve consumo do mesmo, normalmente atribuído à formação de esporo. O consumo pode ter sido ocasionado por limitação de algum micronutriente ou mesmo por limitação de fonte de nitrogênio. Já para a amostra cultivada com o efluente da indústria de biodiesel (glicerol residual), foi constatado um aumento da concentração de biomassa no meio. Do mesmo modo, verificou-se aumento da concentração de polímero. Utilizando o glicerol residual foi observada queda no pH do meio durante o cultivo. A queda do pH pode ter evitado o consumo intracelular do polímero. Os meios com efluente da indústria de laticínio e efluente da indústria de soja o pH aumentou consideravelmente e, juntamente a isso, houve queda da concentração de polímero. Análises dos cromatogramas obtidos para o cultivo com permeado de soro de leite e cultivo com glicerol demonstram um pequeno pico entre os picos do P(3HB) e do ácido benzoico, indicando que pode ter havido a formação de co-polímero.

Foi verificado que *B. megaterium* acumulou polímero em todos os substratos empregados no presente estudo, evidenciando potencial para produção nestes efluentes testados. Sendo o custo da matéria-prima fator determinante para a economia do processo, a utilização de efluentes industriais se mostra vantajosa. O uso desses substratos e a aplicação de outras estratégias complementares levam a viabilidade deste processo. A redução do custo, aliado a necessidade de preservação ambiental, a maior conscientização da população, os limitados recursos de combustíveis fósseis e as variadas características dos PHAs, permitirá que, em futuro próximo, seu uso seja ampliado e os plásticos biodegradáveis possam estar presentes nas mais diversas aplicações.

Como proposição para trabalhos futuros, de acordo com algumas lacunas a serem exploradas identificadas no presente trabalho, encontram-se:

- Para os efluentes da indústria de laticínios e indústria da soja repetir os cultivos, utilizando intervalo de amostragem menor e tempo de cultivo de 48 h, a fim de se verificar o pico máximo de produção de polímero;
- Obter a composição dos efluentes da indústria de laticínios e do efluente da indústria da soja e repetir os cultivos suplementando-os a fim de verificar se o consumo de polímero ocorreu devido à escassez das fontes nutricionais;
- Para o efluente da indústria de biodiesel repetir os cultivos, utilizando intervalo de amostragem menor e tempo de cultivo maior que 48 h, a fim de se verificar o pico máximo de produção de polímero;
- Realizar os cultivos e construir curva padrão para outros monômeros, como o HV e o HHx, a fim de verificar e quantificar a produção de co-polímero.

6 Referências

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

BEAULIEU, M.; BEAULIEU, Y.; MELINARD, J.; PANDIAN, S.; GOULET, J. Influence of Ammonium Salts and Cane Molasses on Growth of *Alcaligenes eutrophus* and Production of Polyhydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 61, n. 1, p. 165-169, 1995.

BIOMER (2012) Disponível em: <http://www.biomer.de/IndexE.html> Acessado em 22 de dezembro de 2012.

BRAUNEGG, G., BONA R., KOLLER, M., WALLNER, E. Sustainable Polymeric Materials from Renewable Resources and Agro-Industrial Wast. Expert Group Meeting on Environmentally Degradable Plastics and Sustainable Development. Institute of Biotechnology, Graz University of Technology, Austria. 5 - 6 Setembro 2002, Trieste, Itália.

BRAUNEGG, G.; BONA, R.; KOLLER, M. Sustainable Polymer Production. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, v. 43, n. 6, p. 1779 - 1793, 2004.

CASSINI, A. C. Estudo de processos alternativos no pré-tratamento de efluentes provenientes da produção de isolados protéicos. 2008. 195 f. 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, 2008.

CAVALHEIRO, J.M.B.T., DE ALMEIDA, M.C.M.D., GRANDFILS, C., DA FONSECA, M.M.R. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochemistry*, v. 44, p. 509–515, 2009.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science*, v. 23, n. 7, p. 1273-1335, 1998.

CHEEKE, P.R.; DAVISON, T.P.; MEYER, R.O.; STANGEL, D.E. Utilization of dried whey by growing finishing swine. *Feedstuff*, v. 45, n. 28, p. 25, 1973.

CHEN, G .Q., KÖNING, K. H. e LAFFERTY, R. M. Occurrence of poly-D(-)-3-hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 84, p. 174–176, 1991.

CHEN, G. –Q. Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications. *Microbiology Monographs*, v. 14, 2010.

CHOI, J.-I.; LEE, S. Y. Process analysis and economic evaluation for Poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Engineering*, v. 17, p. 335-342, 1997.

COMELLA, P. L. Understanding a Sham: When is Recycling, Treatment? *Boston College Environmental Affairs Law Review*, v. 20, 1993.

FACCIN, D. J. L. Cultivo da bactéria *Bacillus megaterium* para a produção do biopolímero poli(3-hidroxiobutirato) e modelagem matemática do bioprocesso. (2007). 105 f. Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2007.

FACCIN, D. J. L.; MARTINS, I.; CARDOZO, N. S. M.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z.; ALVES, T. L. M.; GAMBETTA, 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 & Biotechnology*, v. 84, n. 12, p. 1756-1761, 2009.

FACCIN, D. J. L. Avaliação de condições de cultivo para aumento da produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* e modelagem do bioprocesso. 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, 2012.

HOFFMANN, C. M. Estudo da utilização de concentrado proteico de soro de queijo ultrafiltrado (CPSU), em requeijão cremoso. Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil, 2003.

JULIANO, A. M. M.; PETRUS, J.C.C.; TORRANO, A.D.M. Recuperação por ultrafiltração das proteínas do soro para fabricação de queijos. *Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes*, v. 42, p. 3-6, 1987.

KEMMISH, D. The processing of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) – PHBV. *Journal of Applied Polymer Science*, New York, p. 225-232, 1993.

KIM, B. S.; LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Production of poly- β -hydroxybutyrate by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, Coréia, v. 14, p. 811-816, 1992.

KOLLER, M.; BONA, R.; BRAUNEGG, G.; HERMANN, C.; HORVAT, P.; KROUTIL, M.; MARTINZ, J.; NETO, J.; PEREIRA, L.; VARILA, P. Production of Polyhydroxyalkanoates from Agricultural Waste and Surplus Materials. *Biomacromolecules*, v. 6, n. 2, p. 561-565, 2005.

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

KOMINEK, L. A.; HALVORSON, H. O. Metabolism of poly-beta-hydroxybutyrate and acetoin in *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*, v. 90, n. 5, p. 1251-1259, 1965.

KULPREECHA, S.; BOONRUANGTHAVORN, A.; MEKSIRIPORN, B.; THONGCHUL, N. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 107, n. 3, p. 240-245, Mar 2009.

LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, n. 1, p. 1-14, 1996a.

LEE, S. Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*, v. 14, n. 11, p. 431-438, 1996b.

LEE, S. Y.; CHOI, J.-I.; WANG, H. H. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 25, p. 31-36, 1999.

LÓPEZ, J.; NARANJO, J.; HIGUITA, J.; CUBITTO, M.; CARDONA, C.; VILLAR, M. Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 17, n. 2, p. 250-258, 2012.

MATAVULJ, M.; MOLITORIS, H.-P. Biodegradation of polyhydroxyalkanoate-based plastic (BIOPOL) under different environmental conditions I. Weightloss of substrate. *Hoppea*, v. 61, p. 735-749, 2000.

NODA, I.; SATKOWSKI M.M.; DOWREY A. E.; MARCOTT C. Polymer Alloys of Nodax Copolymers and Poly(lactic acid), *Macromolecular Bioscience*, v. 4, p. 269–275, 2004.

OMAR, S.; RAYES, A.; EQAAB, A.; VOß, I.; STEINBÜCHEL, A. Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. *Biotechnology Letters*, v. 23, n. 14, p. 1119-1123, 2001.

ORHON, D., GORGUN, E., GERMIRLI, F., ARTAN, N. Biological treatability of dairy wastewaters. *Water Resources*, v. 27, p. 625–633, 1993.

OTA, Office of Technology Assessment. Biopolymers: Making materials nature's way - background paper. Report No. OTA-BP-E-102, U.S. Congress, Washington D.C., US Government Printing Office, 1993.

PANDIAN, S. R.; DEEPAK, V.; KALISHWARALAL, K.; RAMESHKUMAR, N.; JEYARAJ, M.; GURUNATHAN, S. Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 705-711, 2010.

PHB INDUSTRIAL (2012) Disponível em: www.biocycle.com.br Acessado em 22 de dezembro de 2012.

PHILIP, S.; SENGUPTA, S.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Effect of Impeller Speed and pH on the Production of Poly(3-hydroxybutyrate) Using *Bacillus cereus* SPV. *Biomacromolecules*, v. 10, n. 4, p. 691-699, 2009.

POSADA, J. A.; NARANJO, J. M.; LÓPEZ, J. A.; HIGUITA, J. C.; CARDONA, C. A. Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 1, p. 310-317, 2011.

PRABHU, N. N.; SANTIMANO, M. C.; MAVINKURVE, S.; BHOSLE, S. N.; GARG, S. Native granule associated short chain length polyhydroxyalkanoate synthase from a marine derived *Bacillus* sp NQ-11/A2. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 97, n. 1, p. 41-50, Jan 2010.

PRIEST, F. G.; GOODFELLOW, M.; TODD, C. A Numerical Classification of the Genus *Bacillus*. *Journal of General Microbiology*, v. 134, n. 7, p. 1847-1882, July 1, 1988.

REDDY, S.; THIRUMALA, M.; MAHMOOD, S. A novel *Bacillus* sp. accumulating poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from a single carbon substrate. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 36, n. 6, p. 837-843, 2009.

REHM, B. H. A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal*, v. 376, p. 15-33, Nov 2003.

SALVADORI, S.; KONRAD, O.; CASARIL, C.; LUMI, M.; SCHMITZ, M. Geração de biogás a partir de lodo de estação de tratamento de efluentes na fabricação de proteína isolada de soja. *Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal*, v. 9, n. 1, p. 128-141, 2012.

SCHINGOETHE, D. J.; SKYBERG, E. W. Lactation and growth of dairy cows and steers from large amounts of dried whey. *Journal Dairy Science* 1981, v. 64, p. 1571-1578, 1980.

SHEN, L.; HAUFE, J.; PATEL, M. K. *Product overview and market projection of emerging bio-based plastics. PRO-BIT 2009*. Copernicus Institute for Sustainable Development and Innovation Utrecht University. June. 2009.

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

STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters*, v. 128, n. 3, p. 219-228, 1995.

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.

SURIYAMONGKOL, P.; WESELAKE, R.; NARINE, S.; MOLONEY, M.; SHAH, S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - A review. *Biotechnology Advances*, v. 25, n. 2, p. 148-175, 2007.

TEPHA (2012) Disponível em: <http://www.tepha.com/> Acessado em 22 de dezembro de 2012.

VALAPPIL, S. P.; PEIRIS, D.; LANGLEY, G. J.; HEMIMAN, J. M.; BOCCACCINI, A. R.; BUCKE, C.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized *Bacillus* spp. *Journal of Biotechnology*, v. 127, n. 3, p. 475-487, Jan 2007.

VARY, P. S. Prime time for *Bacillus megaterium*. *Microbiology*, v. 140, n. 5, p. 1001-1013, May 1, 1994 1994.


WANG, F. L.; LEE, S. Y. Poly(3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 9, p. 3703-3706, Sep 1997.

WANG, F.; LEE, S.Y. High cell density culture of metabolically engineered *Escherichia coli* for the production of poly(3-hydroxybutyrate) in a defined medium. *Biotechnology and Bioengineering*, Coréia, v. 58, n. 2-3, p. 325-328, 1998.

WU, Q.; HUANG, H.; HU, G.; CHEN, J.; HO, K. P.; CHEN, G.-Q. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 80, n. 2, p. 111-118, 2001.

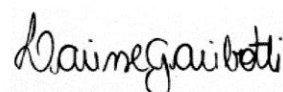
ANEXO A

Laudo analítico do efluente da indústria do biodiesel.

	Laudo Analítico
---	------------------------

Produto:	Número do Lote:	Data de Carregamento:
9- LICERINA BRUTA	890000001506	

Item Analítico	Unidade	Resultado	Especificação (1)		Métodos
			Min	Máx	
Umidade	% (m)	11.720	-	13.000	AOCS Ca 2e-84
Glicerol	% (m)	81.780	80.000	-	Official Mon.XXI
Cinza	% (m)	5.820	-	8.000	Official Mon.XXI
Cloretos	% (m)	6.000	-	7.000	Método de Mohr
pH		5.370	4.500	9.000	-
MONG	% (m)	0.680	-	2.000	Cálculo



LARISSÉ GARIBOTTI
CRQ 05302605 - 5ª Região / CREA 10.471D