

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM
ENGENHARIA QUÍMICA – NÍVEL DE MESTRADO

**ESTRATÉGIAS DE CULTIVO UTILIZANDO RESÍDUOS DAS INDÚSTRIAS
PROCESSADORAS DE ALIMENTOS E ÓLEO DE SOJA PARA PRODUÇÃO DE
POLI (3-HIDROXIBUTIRATO)**

MANOELA ESTEFÂNIA BOFF ZORTÉA

Toledo – PR – BRASIL

Fevereiro de 2012

MANOELA ESTEFÂNIA BOFF ZORTÉA

**ESTRATÉGIAS DE CULTIVO UTILIZANDO RESÍDUOS DAS INDÚSTRIAS
PROCESSADORAS DE ALIMENTOS E ÓLEO DE SOJA PARA PRODUÇÃO DE
POLI (3-HIDROXIBUTIRATO)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Lady Fiorese

Co-orientador: Prof. Dr. Salah Din Mahmud Hasan

Toledo – PR – BRASIL

Fevereiro de 2012

Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca Universitária
UNIOESTE/Campus de Toledo.
Bibliotecária: Marilene de Fátima Donadel - CRB – 9/924

G496p Giongo, Citeli
Produção de ácidos graxos voláteis por biodigestão anaeróbia da manipueira / Citeli Giongo. -- Toledo, PR : [s. n.], 2011.
ix; 66 f. : il., tabs, graf.

Orientador: Drº. Salah Din Mahmud Hasan
Co-orientadora: Dra. Mônica Lady Fiorese
Dissertação (Mestre em Engenharia Química) -
Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Campus de Toledo.
Centro de Engenharias e Ciências Exatas.

1. Ácidos graxos voláteis – Produção 2. Fermentação 3. Reatores anaeróbios 4. Manipueira – Resíduo industrial 5. Planejamento experimental I. Hasan, Salah Din Mahmud, Or. II. Fiorese, Mônica Lady, Or. III. T

CDD 20. ed. 660.28449
660.283
660.63

*Dedico este trabalho ao meu marido,
com todo meu amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao findar este trabalho, à Deus e àqueles que de alguma forma colaboraram para a realização e concretização de mais esta etapa em minha vida:

Primeiramente agradeço ao meu marido Rodrigo pela dedicação, incentivo, compreensão, paciência, carinho e amor incondicional.

À professora Dra. Mônica Lady Fiorese, minha orientadora, e ao professor Dr. Salah Din Mahmud Hasan, pelas orientações e conselhos na construção deste trabalho, por proporcionarem e incentivarem o meu aprendizado e crescimento científico.

Ao aluno de iniciação científica e amigo Tércio Savoldi por dedicar a mim amizade verdadeira e confiança, apoio, companheirismo, além de toda a ajuda nas pesquisas.

À amiga Thaís Mendes Porto pela belíssima companhia, conversas, risadas e carinhosa amizade.

À minha família, em especial à minha mãe e minha irmã Greta, por todo incentivo, carinho e momentos iluminados.

Aos alunos da UNIOESTE Fabiane Bach, Maryana Gongolesky, Juliana Passamani Sandri e Jeferson Petry por todo respeito, compreensão, apoio e auxílio nas análises.

A FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA pela aprovação do projeto e repasse de recurso financeiro para a aquisição de equipamentos.

À UFSC-ENGEBIO em especial a Jaciane Ienczak pela doação de materiais e reagentes utilizados nesta pesquisa e também por toda a ajuda fornecida.

A UFSC-ENGEBIO e UNIVILLE pela doação do micro-organismo utilizado neste estudo.

Às indústrias Laticínio Lacto Mesa e Fecularia Zadimel pela doação dos resíduos.

À empresa Rochesa S.A. tecnologia em tintas e vernizes, ao Henrique Silva de Araújo, Rafael Oliveira e Gabriel Cavaleari Neto, pela disponibilidade do desenvolvimento das análises de determinação de P(3HB).

À empresa Pratti-Donaduzzi pela disponibilidade de utilização do equipamento cromatógrafo a gás.

À Faculdade UNIPAR pela disponibilidade de utilização dos equipamentos de centrifugação de amostra.

Aos membros da banca, por aceitarem participar da defesa desta dissertação, enriquecendo este trabalho.

À CAPES por financiar minha bolsa de mestrado.

Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.

Dalai Lama

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	Os plásticos e os impactos ambientais ocasionados	4
2.2	Polímeros biodegradáveis.....	6
2.3	Biodegradação	8
2.4	Poli-hidroxialcanoatos – PHAs	10
2.5	Poli (3-hidroxi-butirato) – P(3HB)	13
2.6	Organismos produtores de PHAs	14
2.7	<i>Cupriavidus necator</i>	14
2.8	Metabolismo do <i>Cupriavidus necator</i> – Síntese do P(3HB).....	17
2.9	Suplementos nutricionais – Resíduos das indústrias processadoras de alimentos e matéria prima renovável	20
2.9.1	Resíduo amiláceo (bagaço hidrolisado)	22
2.9.2	Soro de queijo.....	23
2.9.3	Óleos vegetais.....	25
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	Caracterização dos resíduos utilizados como suplementos.....	27
3.1.1	Determinação do pH.....	27
3.1.2	Determinação da alcalinidade e acidez	28
3.1.3	Determinação dos sólidos totais e sólidos totais voláteis.....	28
3.1.4	Determinação de açúcares redutores	28
3.1.5	Determinação da demanda química de oxigênio (DQO)	28
3.1.6	Determinação da demanda bioquímica de oxigênio (DBO)	28
3.1.7	Determinação de nitrogênio total	28
3.1.8	Determinação de fósforo total.....	29
3.2	Micro-organismo	29
3.3	Meios de cultura	29
3.4	Condições das pré-culturas.....	30
3.5	Condições de cultivo para crescimento (planejamento experimental) e demais experimentos.....	31
3.5.1	Suplemento nutricional.....	32
3.5.2	Estratégias de alimentação	32
3.6	Planejamento experimental e análise estatística.....	33

3.7	Demais experimentos – Cultivos limitados e com maior quantidade de suplementos	34
3.8	Técnicas Analíticas.....	35
3.8.1	Amostragem	35
3.8.2	Determinações analíticas	35
3.8.2.1	Determinação da concentração de biomassa (XT)	35
3.8.2.2	Determinação de proteína.....	35
3.8.2.3	Dosagem de açúcares	35
3.8.2.4	Determinação de nitrogênio	36
3.8.2.5	Determinação de P(3HB)	36
3.9	Tratamento de dados	36
3.9.1	Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{m\acute{a}x}$).....	36
3.9.2	Fatores de conversão	38
3.9.2.1	Fator de conversão de substrato em biomassa total	38
3.9.2.2	Fator de conversão de nitrogênio em biomassa total	38
3.9.3	Produtividade em P(3HB).....	39
4.0	RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
4.1	Caracterização dos resíduos	40
4.2	Comportamento de <i>C. necator</i> em diferentes composições de cultivos.....	42
4.3	Análise e comparação do comportamento de <i>C. necator</i> nos diferentes meios de cultivo	51
4.4	Acompanhamento do comportamento de <i>C. necator</i> em cultivos limitados em nitrogênio e com maior quantidade de suplementos	54
5.0	CONCLUSÕES E SUGESTÕES	63
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXOS	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Mercado brasileiro de embalagens.....	4
Figura 2.2 - Produção do setor de produtos plásticos no Brasil (em mil toneladas).....	5
Figura 2.3 - Consumo aparente de produtos plásticos no Brasil (em mil toneladas).....	5
Figura 2.4 - Classificação de polímeros biodegradáveis.....	7
Figura 2.5 - Biociclo dos poli-hidroxicarboxilatos.....	10
Figura 2.6 - Formação de grânulo de P(3HB) intracelular na membrana lipídica.....	11
Figura 2.7 - Células bacterianas contendo grânulos de polímero biodegradável, da família dos poli-hidroxicarboxilatos (PHA) no seu interior (fotomicrografia eletrônica).....	11
Figura 2.8 - Estrutura molecular do poli (3-hidroxibutirato).....	13
Figura 2.9 - <i>Cupriavidus necator</i> em fase de crescimento; e fase de produção.....	15
Figura 2.10 - Curvas de crescimento de <i>C. necator</i> em glicose expressa em LN (X/X ₀) pelo tempo (h) nas temperaturas de 30°C, 32,5°C, 35°C, 37,5°C e 40°C. As linhas representam o modelo de Gompertz Modificado ajustado aos dados experimentais.....	15
Figura 2.11 - Microscopia de elétrons de transmissão (TEM) de <i>C. necator</i> na produção de P(3HB).....	16
Figura 2.12 - Produtos do acetil-CoA em condições de crescimento balanceado e de excesso e escassez de carbono.....	19
Figura 2.13 - Síntese de P(3HB) a partir de acetil-CoA em <i>C. necator</i>	20
Figura 3.1 - Frascos adaptados contendo os cultivos.....	31
Figura 3.2 - Curva de crescimento microbiano com os parâmetros biológicos em função do tempo.....	37
Figura 4.1 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em g.L ⁻¹ , em função do tempo para o ensaio 01 (padrão: 0 % H, 0 % S, 0 % OS) do planejamento.....	43
Figura 4.2 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em g.L ⁻¹ , em função do tempo para o ensaio 02 (10 % H) do planejamento.....	44
Figura 4.3 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em g.L ⁻¹ , em função do tempo para o ensaio 03 (10 % S) do planejamento.....	44
Figura 4.4 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em g.L ⁻¹ , em função do tempo para o ensaio 04 (10 % H + 10 % S) do planejamento.....	45
Figura 4.5 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em g.L ⁻¹ , em função do tempo para o ensaio 05 (10 % OS) do planejamento.....	46

Figura 4.6 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em $g.L^{-1}$, em função do tempo para o ensaio 06 (10 % H + 10 % OS) do planejamento.....	46
Figura 4.7 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em $g.L^{-1}$, em função do tempo para o ensaio 07 (10 % S + 10 % OS) do planejamento.....	47
Figura 4.8 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em $g.L^{-1}$, em função do tempo para o ensaio 08 (10 % H + 10 % S + 10 % OS) do planejamento.....	48
Figura 4.9 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em $g.L^{-1}$, em função do tempo para o ensaio 09 (triplicata do ponto central: 5 % H + 5 % S + 5 % OS) do planejamento.....	49
Figura 4.10 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em $g.L^{-1}$, em função do tempo para o ensaio 10 (triplicata do ponto central: 5 % H + 5 % S + 5 % OS) do planejamento.....	49
Figura 4.11 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em $g.L^{-1}$, em função do tempo para o ensaio 11 (triplicata do ponto central: 5 % H + 5 % S + 5 % OS) do planejamento.....	50
Figura 4.12 - Gráfico de Pareto mostrando os efeitos sobre as fases de crescimento.....	53
Figura 4.13 - Gráfico de Pareto mostrando os efeitos sobre as fases de crescimento, incluindo a curvatura.....	54
Figura 4.14 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em $g.L^{-1}$, em função do tempo para o ensaio A (padrão: 0 % H, 0 % S, 0 % OS).....	55
Figura 4.15 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em $g.L^{-1}$, em função do tempo para o ensaio B (100 % H).....	56
Figura 4.16 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em $g.L^{-1}$, em função do tempo para o ensaio C (50 % S).....	57
Figura 4.17 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em $g.L^{-1}$, em função do tempo para o ensaio D (5 % H, 5 % S, 10 % OS).....	58
Figura A.1 - Curva de calibração para a determinação da concentração de açúcares redutores pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS).....	76
Figura A.2 - Curva padrão para a determinação da demanda química de oxigênio.....	77
Figura A.3 - Curva de calibração de determinação da concentração de proteínas pelo método de Biureto, utilizando-se albumina bovina como padrão.....	81
Figura A.4 - Curva típica padrão para a determinação da concentração de P(3HB).....	83
Figura A.5 - Cromatograma do ponto 01 da curva padrão.....	83
Figura A.6 - Cromatograma do ponto 02 da curva padrão.....	84
Figura A.7 - Cromatograma do ponto 03 da curva padrão.....	84
Figura A.8 - Cromatograma do ponto 04 da curva padrão.....	84
Figura A.9 - Cromatograma do ponto 05 da curva padrão.....	85

Figura A.10 - Cromatograma do ponto 06 da curva padrão.....	85
Figura A.11 - Cromatograma do ponto 07 da curva padrão.....	85
Figura A.12 - Cromatograma do ponto 08 da curva padrão.....	86
Figura A.13 - Cromatograma da amostra do ensaio A, 11 h.....	86
Figura A.14 - Cromatograma da amostra do ensaio A, 25 h.....	86
Figura A.15 - Cromatograma da amostra do ensaio A, 39 h.....	87
Figura A.16 - Cromatograma da amostra do ensaio A, 80 h.....	87
Figura A.17 - Cromatograma da amostra do ensaio B, 64 h.....	87
Figura A.18 - Cromatograma da amostra do ensaio B, 73 h.....	88
Figura A.19 - Cromatograma da amostra do ensaio B, 87 h.....	88
Figura A.20 - Cromatograma da amostra do ensaio B, 96 h.....	88
Figura A.21 - Cromatograma da amostra do ensaio C, 64 h.....	89
Figura A.22 - Cromatograma da amostra do ensaio C, 73 h.....	89
Figura A.23 - Cromatograma da amostra do ensaio C, 87 h.....	89
Figura A.24 - Cromatograma da amostra do ensaio C, 96 h.....	90
Figura A.25 - Cromatograma da amostra do ensaio D, 39 h.....	90
Figura A.26 - Cromatograma da amostra do ensaio D, 49 h.....	90
Figura A.27 - Cromatograma da amostra do ensaio D, 56 h.....	91
Figura A.28 - Cromatograma da amostra do ensaio D, 64 h.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Consumo per capita brasileiro de plástico (kg/hab)	5
Tabela 2.2 - Estrutura geral dos PHAs para diferentes monômeros.....	12
Tabela 3.1 - Composição do meio mineral sem limitação em nutrientes.....	29
Tabela 3.2 - Composição da solução concentrada de elementos traço.....	30
Tabela 3.3 - Níveis reais e codificados das variáveis para planejamento experimental fatorial completo 2 ³	33
Tabela 3.4 - Matriz de planejamento fatorial completo 2 ³ com variáveis codificadas e reais	33
Tabela 3.5 - Descrição dos meios utilizados nos demais experimentos.....	34
Tabela 4.1 - Caracterização dos resíduos utilizados como suplementos.....	40
Tabela 4.2 - Resumo da fase de crescimento (fase lag, pré-exponencial, log e total de crescimento (lag+pré exp+log)) dos 11 ensaios do planejamento experimental.....	51
Tabela 4.3 - Matriz de dados da fase de crescimento.....	52
Tabela 4.4 - Efeitos e coeficientes ($\alpha = 0,10$).....	53
Tabela 4.5 - Efeitos e coeficientes ($\alpha = 0,10$).....	53
Tabela 4.6 - Resumo da fase de crescimento para os demais experimentos	60
Tabela A.1 - Procedimento de determinação de nitrogênio amoniacal.....	82

LISTA DE ABREVIACOES

ATP	adenosina trifosfato
DBO	demanda bioquímica de oxigênio
DQO	demanda química de oxigênio
ETE	estaco de tratamento de efluente
H	hidrolisado amiláceo
MM	meio mineral
NA	gar nutriente
NB	caldo nutriente (<i>Nutrient Broth</i>)
OS	leo de soja
P(3HB)	Polihidroxibutirato
PHB-HV	polihidroxibutirato/valerato
PHAs	Polihidroxialcanoatos
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PE	Polietileno
PVC	poli (cloreto de vinila)
rpm	rotações por minuto
S	soro de queijo
TCA	ciclo dos ácidos tricarboxílicos
vvm	volume de ar por volume de meio, por minuto
XT	biomassa total
$Y_{XT/S}$	fator de conversão de substrato em biomassa total
$Y_{Xr/S}$	fator de conversão de substrato em biomassa residual
$Y_{XT/N}$	fator de conversão de nitrogênio em biomassa total
$Y_{Xr/N}$	fator de conversão de nitrogênio em biomassa residual
$\mu_{máx}$	velocidade específica máxima de crescimento
μ_{XT}	velocidade específica de crescimento

ESTRATÉGIAS DE CULTIVO UTILIZANDO RESÍDUOS DAS INDÚSTRIAS PROCESSADORAS DE ALIMENTOS E ÓLEO DE SOJA PARA PRODUÇÃO DE POLI (3-HIDROXIBUTIRATO)

AUTORA: MANOELA ESTEFÂNIA BOFF ZORTÉA

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MÔNICA LADY FIORESE

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 – Toledo – PR, Brasil, defendida em 16 de fevereiro de 2012. 107 p.

RESUMO

A diversidade de utilização de materiais poliméricos acarreta preocupação devido a utilização de fonte não renovável para a sua produção, bem como os problemas ambientais causados pelo acúmulo do volume de lixo sólido gerado. Procurando minimizar este problema buscaram-se alternativas de produtos semelhantes aos plásticos de origem petroquímica, uma delas é o polímero biodegradável. Os polihidroxicarboxilatos (PHAs) são poliésteres sintetizados por micro-organismos como substâncias naturais de reserva de carbono e energia, sendo acumulados pela célula microbiana na forma de grânulos intracelulares, podendo representar até 80% da massa seca celular. O polímero mais estudado desta classe é o polihidroxibutirato (P(3HB)) um polímero biodegradável que possui características semelhantes às dos plásticos provenientes de petróleo. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver estratégias de crescimento da bactéria *Cupriavidus necator* para produção de poli (3-hidroxibutirato), utilizando meio suplementado com bagaço de mandioca, soro de queijo e óleo de soja. Os primeiros cultivos foram realizados seguindo um planejamento experimental 2³, visando obter nesta etapa a melhor condição de crescimento com os suplementos testados. Os demais experimentos utilizaram meio limitado em nitrogênio e maior quantidade de suplementos. Os resultados obtidos através do planejamento experimental mostraram que as maiores produções de biomassa na fase de crescimento foram obtidas nos experimentos cujo meio apresentava os três suplementos em seus níveis centrais, seguido pelos ensaios que continham os suplementos soro de queijo e óleo de soja combinados ou somente a presença de um destes dois componentes. Quatro experimentos com aumento nas concentrações de

suplemento mostraram que os resíduos soro de queijo e hidrolisado amiláceo apresentaram-se como bons meios de cultivo para o crescimento de *C. necator*, sendo que a maior produção de biomassa celular ($5,8 \text{ g.L}^{-1}$) no momento da limitação do nutriente nitrogênio ocorreu no cultivo contendo 100 % de hidrolisado amiláceo e o melhor fator de conversão de substrato em células foi obtido no meio contendo maior quantidade do suplemento soro de queijo (50 %).

CULTIVATION STRATEGIES USING WASTES OF FOOD PROCESSING INDUSTRIES AND SOYBEAN OIL FOR THE PRODUCTION POLYHYDROXYBUTYRATE

AUTHOR: MANOELA ESTEFÂNIA BOFF ZORTÉA

SUPERVISOR: PROFA. DRA. MÔNICA LADY FIORESE

Máster Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; Western Paraná State University; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 - Toledo - PR, Brazil, presented on February, 16th 2012. 107 p.

ABSTRACT

The diversity of use of polymeric materials causes concern because the use of non-renewable source for its production, as well as the environmental problems caused by the accumulation of the volume of solid waste generated. Seeking to minimize this problem were sought alternative products similar to plastics of petrochemical origin, one of them is the biodegradable polymer. The polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polyesters synthesized by microorganisms from natural substances such as carbon and energy reserves, and accumulated by microbial cell in the form of intracellular granules, which may represent up to 80 % of the dry cell. The most studied polymer of this class is the polyhydroxybutyrate (P(3HB)) a biodegradable polymer that has similar features to the plastics from petroleum. This study aimed to develop for growth of bacteria *Cupriavidus necator* for the production of poly (3-hydroxybutyrate) using medium supplemented with cassava bagasse, whey and soybean oil. The first crops were carried out using a 2³ factorial design, to obtain the best condition at this stage of growth with the supplements tested. Other experiments used medium limited in nitrogen and higher amounts of supplements. The results obtained from the experimental design showed that the highest biomass production during growth was obtained in experiments which showed through the three supplements in their central levels, followed by testing supplements containing cheese whey and soybean oil combined or the presence of only one of these two components. Four experiments with increasing concentrations of supplement showed that waste and cheese whey hydrolyzed starch presented as good culture media for growth of *C. necator*, and the

increased production of cell biomass ($5,8 \text{ g.L}^{-1}$) at the time of the nutrient nitrogen limitation occurred in the culture containing 100 % hydrolyzed starch conversion factor and the best substrate was obtained in cells in medium containing the highest amount supplement cheese whey (50 %).

1. INTRODUÇÃO

Os materiais poliméricos estão presentes na vida cotidiana sob variadas formas, incluindo embalagens, filmes, lubrificantes e agentes de revestimento. A razão para esta diversidade é o fato de possuírem excelentes propriedades como, durabilidade, resistência à degradação e à corrosão por ácidos e bases, e ainda pelo fato de serem de baixo custo. Por outro lado, o acúmulo de resíduos plásticos vem se tornando um sério problema ambiental por não se degradarem após o uso (LEE *et al.*, 2002 citado por GARCIA, 2006). Estes problemas, aliados à emissão de compostos tóxicos quando da incineração destes produtos, fazem com que surja a necessidade de os substituir por alternativas viáveis do ponto de vista ambiental e econômico (PANDEY, 2004).

Em resposta à crescente preocupação com os problemas ambientais causados pela produção e acúmulo de materiais plásticos de origem petroquímica, bem como o esgotamento das fontes de combustíveis fósseis, muitos países estão realizando estudos de gerenciamento e diminuição do volume de lixo sólido, buscando ainda a produção de materiais plásticos biodegradáveis, a partir de fontes renováveis de carbono. Portanto, estes novos materiais devem possuir as propriedades desejáveis dos plásticos convencionais, serem produzidos a partir de substratos renováveis e ainda serem completa e rapidamente biodegradados, quando descartados no meio ambiente (PIEMOLINI, 2004).

Em virtude de tais acontecimentos, mundialmente na década de 80, e no Brasil desde meados da década de 90, teve início o aperfeiçoamento de tecnologias para a produção de plásticos biodegradáveis e biocompatíveis empregando matéria-prima renovável pela agricultura, em especial derivados da cana-de-açúcar, ácido láctico, milho e proteína da soja ou até mesmo resíduos industriais.

Após um levantamento de oportunidades, selecionou-se um grupo de polímeros da família dos poli-hidroxialcanoatos (PHAs) que podem ser produzidos por bactérias a partir de carboidratos. Segundo SILVA *et al.* (2001), tais polímeros, em condições apropriadas de cultivo bacteriano, são acumulados na forma de grânulos intracelulares, os quais podem ser separados e removidos após a lise celular gerando uma resina com propriedades semelhantes às dos plásticos de origem petroquímica, com a vantagem de poderem ser biodegradados no ambiente por micro-organismos nele existentes em curto espaço de tempo após o descarte.

O poli (3-hidroxi-butirato) (P(3HB)) constituído por monômeros de 3-hidroxi-butirato, é o PHA mais bem caracterizado e o acumulado com maior frequência por bactérias (MADIGAN *et al.*, 2000). O P(3HB) é produzido através de culturas bacterianas, com predominância de utilização da bactéria *Ralstonia eutropha* atualmente denominada de *Cupriavidus necator*. A biossíntese deste polímero permite um processo cíclico sustentável através de fontes renováveis. O P(3HB) e seus copolímeros são poliésteres biodegradáveis sendo totalmente degradado a CO₂ e água por uma enorme quantidade de fungos e bactérias.

O uso de P(3HB), cujas propriedades termoplásticas e mecânicas se assemelham às do polipropileno, em substituição a estes plásticos convencionais, tem sido inibido pelo alto custo de produção quando comparado ao custo dos polímeros de origem petroquímica.

De fato, os custos no processo com a fonte de carbono e a recuperação do polímero são os dois maiores fatores responsáveis pelo elevado preço dos PHAs. Estima-se que 40 % do custo seja referente a fonte de carbono (etapa de produção), sendo o impacto do custo de recuperação de PHAs no custo total do processo de produção equivalente a até 50 % do valor do produto, dependendo de variáveis como o processo de separação empregado e o teor de PHA acumulado na biomassa, uma vez que o biopolímero é um produto intracelular, e os métodos adotados para recuperação e purificação do P(3HB) são complexos (NONATO *et al.*, 2001).

A utilização de substratos alternativos de baixo custo em processos fermentativos, tais como resíduos agro-industriais, permite a redução dos custos de produção minimizando problemas ambientais, pois auxilia na destinação desses resíduos (WOICIECHOWSKI, 2001). A literatura cita o uso de glicose e frutose como fontes de carbono preferenciais para a produção de biopolímeros (SUTHERLAND, 2002), porém, algumas fontes alternativas têm sido sugeridas, tais como cana-de-açúcar, beterraba e melão cítrico (FIORESE, 2004; IENCZAK, 2006), além dos resíduos industriais de soja, batata, mandioca, arroz, maçã, soro de leite, casca de café, entre outros.

A relevância desta pesquisa pela obtenção de P(3HB) reside, no fato da mesma, contribuir para a redução dos custos de produção deste polímero, contribuir na redução considerável do volume de resíduos sólidos que permanecem acumulados durante muitos anos até sua total decomposição quando usados plásticos de origem petroquímica, além de

fornecer uma opção interessante de aumento de valor agregado às indústrias geradoras dos resíduos estudados nesta pesquisa.

O objetivo geral desta pesquisa consiste em desenvolver estratégias de crescimento da bactéria *Cupriavidus necator* visando à produção de poli (3-hidroxi butirato), com e sem suplementação do meio, utilizando resíduos das indústrias processadoras de alimentos, tais como: bagaço de mandioca hidrolisado e soro de queijo, além de suplementação com óleo de soja.

Os objetivos específicos são:

- Utilizar meio suplementado com resíduos das indústrias processadoras de alimentos e óleo de soja e avaliar a influência dos mesmos no crescimento de *Cupriavidus necator*, visando obter maior quantidade de células para a produção de P(3HB), através de um planejamento experimental 2³;

- Avaliar a capacidade do crescimento de *Cupriavidus necator* e produção de P(3HB) aumentando as concentrações dos suplementos a fim de utilizá-los em substituição aos componentes sintéticos do meio, principalmente a fonte de carbono.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Os plásticos e os impactos ambientais ocasionados

O desenvolvimento sócioeconômico e a evolução dos hábitos e modos de vida geram consumo excessivo, conduzindo a um uso indiscriminado dos recursos naturais e à geração de grandes volumes de resíduos (GARBOSA & TRINDADE, 2008; ZENI & PENDRAK, 2006).

Desde a década passada, o mercado brasileiro de embalagens já era liderado pelo plástico (38 %), seguido pelo papelão (33 %) e o metal (21 %), com fatias próximas de mercado. O vidro (6 %) e a madeira (2 %) obtiveram porções bem menos representativas, conforme ilustra a figura 2.1 (REVISTA PLÁSTICO MODERNO, 2002).

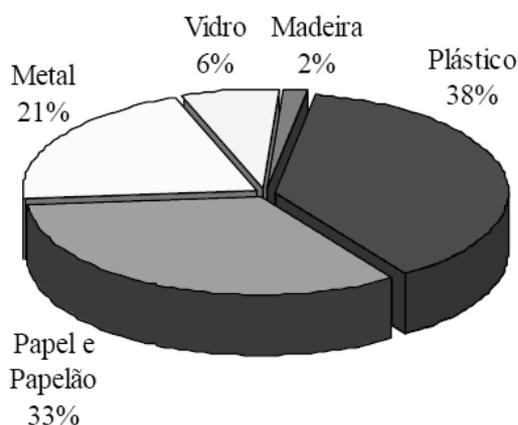


Figura 2.1 - Mercado brasileiro de embalagens
Fonte: REVISTA PLÁSTICO MODERNO, 2002.

No decorrer do século, o uso de plásticos tem se tornado cada vez mais frequente na sociedade, sendo a sua produção mundial da ordem de 150 milhões de toneladas ano, e o consumo per capita brasileiro correspondente a 28 kg por pessoa, por ano em média, o que significa um crescimento de cerca de 20 % em apenas 10 anos. Dados estatísticos da ABIPLAST (2010) mostram que, no Brasil, a produção total anual de transformados de plástico de origem petroquímica em 2009 foi de 5,2 milhões de toneladas. As figuras 2.2 e 2.3 ilustram a evolução da produção de transformados plásticos e do consumo aparente dos mesmos, enquanto que a tabela 2.1, mostra o consumo per capita brasileiro destes produtos.

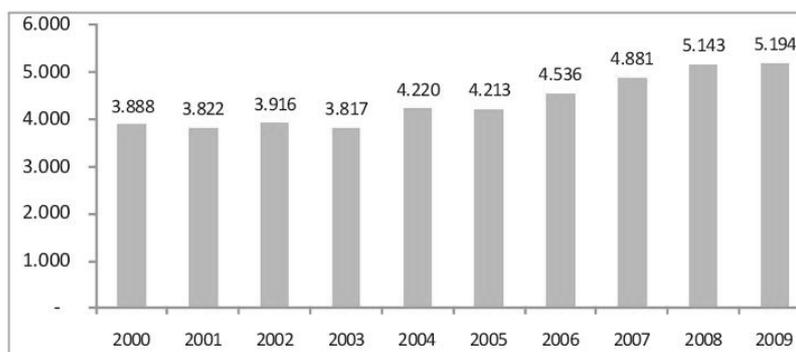


Figura 2.2 - Produção do setor de produtos plásticos no Brasil (em mil toneladas)
Fonte: ABIPLAST, 2010.

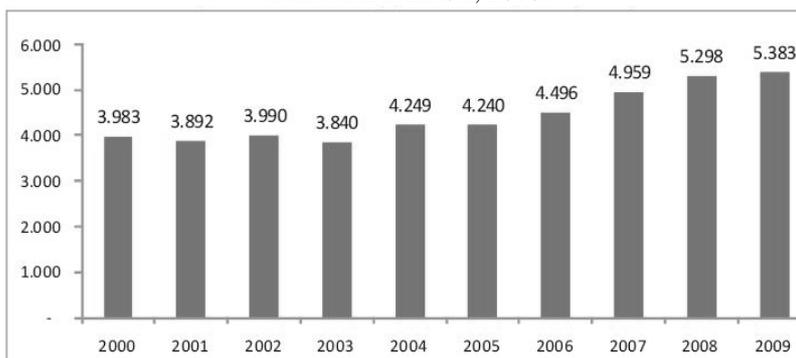


Figura 2.3 - Consumo aparente de produtos plásticos no Brasil (em mil toneladas)
Fonte: ABIPLAST, 2010.

Tabela 2.1 - Consumo per capita brasileiro de plástico (kg/hab)

2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
23,41	22,57	22,85	21,71	23,72	23,38	24,49	26,7	27,74	27,94

Variadas aplicações acarretaram uma grande produtividade deste insumo, conduzindo a uma enorme geração de resíduos sólidos. Uma das grandes virtudes dos plásticos está na sua durabilidade, entretanto, esta se tornou também seu maior problema, em se tratando de seu descarte (RODRIGUES, 2005a), uma vez que sua taxa de geração é muito maior que sua taxa de degradação.

Segundo MIRALLES (1999), mais de 30 % dos plásticos que são utilizados diariamente duram apenas os segundos que levamos para desembulhar um produto e rapidamente serão descartados nos aterros sanitários, que já estão saturados de resíduos plásticos. Tal acúmulo de lixo dificulta a circulação de líquidos e gases e retarda a estabilização de matéria orgânica, causando danos à natureza (SANTOS *et al.*, 2001; FRANCHETTI & MARCONATO, 2006).

Dentre os maiores problemas ambientais relacionados à utilização de materiais poliméricos, tais como o polipropileno (PP), poliestireno (PS), polietileno (PE), poli (cloreto de vinila) (PVC), entre outros, podem ser destacados o elevado tempo de

degradação e a utilização de recursos não renováveis a curto prazo derivados do petróleo (OTAKE *et al.*, 1995).

Recentemente, esforços visando preservar o ecossistema têm levado à busca de novos materiais poliméricos que possam substituir parcialmente os materiais sintéticos (CARASCHI *et al.*, 2002; ROSA *et al.*, 2002, citados por QUINES, 2010). Como alternativas para a minimização dos impactos causados pelos plásticos ao meio ambiente, vários estudos têm se voltado ao desenvolvimento e ao processamento dos polímeros biodegradáveis, que vêm despertando um crescente interesse devido à amplitude de suas aplicações, que não ficam restritas somente à área ambiental, mas também à área biomédica (DUARTE *et al.*, 2004).

2.2 Polímeros biodegradáveis

Uma vasta gama de alternativas biodegradáveis tem sido proposta para mitigar o problema dos plásticos convencionais. A indústria mundial do plástico investiu na “onda verde” e trouxe à tona uma diversidade de polímeros sob o prefixo “bio”. O apelo embutido nessas três letras tem sido forte o suficiente para converter uma multidão ao redor do mundo.

De acordo com FRANCHETTI & MARCONATO (2006), os chamados biopolímeros são polímeros formados durante o ciclo de crescimento de organismos vivos, denominados então, de polímeros naturais. Sua síntese envolve, geralmente, reações catalisadas por enzimas e reações de crescimento de cadeia a partir de monômeros ativados, que são formados dentro das células por processos metabólicos complexos.

Quando os polímeros são considerados biodegradáveis, estes deverão ter a capacidade de se degradarem em segurança por meios biológicos, ou seja, a biodegradação de um determinado material ocorre quando ele é usado como nutriente por um determinado conjunto de micro-organismos (bactérias, fungos ou algas) que existe no meio ambiente onde o material vai ser degradado, gerando CO₂, CH₄, componentes celulares e outros produtos, segundo estabelecido pela “*American Standard for Testing and Methods*” (ASTM-D-833) (LEE & CHOI, 1998; RAGHVAN, 1995, citados por FRANCHETTI & MARCONATO, 2006). Ou de outro modo, são materiais que se degradam em dióxido de carbono, água e biomassa, como resultado da ação de organismos vivos ou enzimas (ROSA *et al.*, 2004).

Os polímeros biodegradáveis podem ser classificados de acordo com a sua composição química, com o seu método de síntese, com o seu método de processamento, com a sua importância econômica, com a sua aplicação, entre outras formas. Contudo, segundo VERHOOGT *et al.* (1994), eles podem ser classificados em duas categorias de acordo com a sua fonte de obtenção: rotas sintéticas ou naturais, incluindo plantas e micro-organismos, conforme esquema apresentado na figura 2.4.

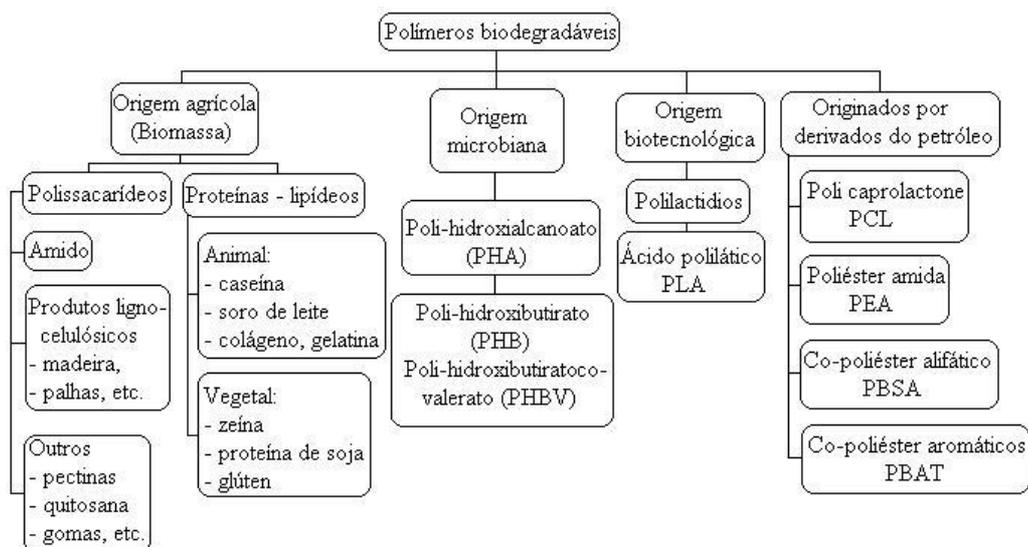


Figura 2.4 - Classificação de polímeros biodegradáveis

Os polímeros biodegradáveis ou polímeros naturais encontram-se divididos em 4 categorias:

a) Polissacarídeos: são formados basicamente por unidades de glicose, ligadas como anéis de grupos acetais (aldeído e álcool) e, portanto, com grande quantidade de grupos hidroxilas (alta hidrofiliçidade). Os principais polissacarídeos de interesse industrial são celulose, e amido, havendo uma atenção especial aos carboidratos mais complexos como quitosana, quitinas e xantanas (CHANDRA & RUSTIGI, 1998).

b) Ácidos algínicos: são formados de monômeros de ácido manurônico e gulurônico, são solúveis em água e tornam-se insolúveis na presença de cátions, como cálcio, berílio, alumínio e ferro, formando géis, que podem servir para liberação controlada de drogas em sistemas vivos, para encapsulamento de herbicidas, micro-organismos e células (CHANDRA & RUSTIGI, 1998).

c) Polipeptídeos naturais: gelatinas são polímeros biodegradáveis, consistindo de proteínas do tipo animal, com grande aplicação industrial, farmacêutica e biomédica,

empregados como coberturas e micro-encapsulação de drogas e no preparo de hidrogéis (FRANCHETTI & MARCONATO, 2006).

d) Poliésteres bacterianos: são poliésteres naturais, produzidos por uma grande variedade de bactérias, como materiais de reserva intracelular, e têm sido alvo de muita atenção para aplicações comerciais, como polímeros biodegradáveis, vantajosamente produzidos por fontes renováveis. Os mais conhecidos são os poli-hidroxialcanoatos, principalmente o poli (3-hidroxiбутирато) (P(3HB)) e poli (3-hidroxiбутирато-*co*-3-hidroxiуаlerato) (P(3HB-*co*-3HV)) (CHANDRA & RUSTIGI, 1998; REDDY *et al.*, 2003).

Segundo reportagem de RETO (2010), publicada na Revista Plástico Moderno, estudos brasileiros envolvendo a produção de resinas biodegradáveis derivadas de fontes renováveis existem já há algum tempo. Envolvida com o tema desde 1992, a Usina da Pedra implantou três anos depois, em Serrana-SP, uma unidade em escala piloto, onde foi testada a síntese de um poliéster derivado da cana-de-açúcar, biodegradável e compostável, o poli (3-hidroxiбутирато) (P(3HB)) e do seu copolímero, o poli-hidroxiбутирато/уаlerato (PHB-HV). Cinco anos mais tarde, o grupo Balbo entrou na sociedade e constituiu a PHB Industrial, atualmente detentora do nome comercial Biocycle em seus produtos. A Copersucar (antiga Cooperativa dos Produtores de Cana, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo, hoje Copersucar S.A.) e o Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) participaram do projeto até a instalação da unidade piloto, quando se desligaram do empreendimento. Hoje a PHB responde pelo desenvolvimento e propriedade da tecnologia.

De acordo com a mesma reportagem publicada, o impacto ambiental seria minimizado graças à biocompatibilidade do P(3HB). Em contato com o meio ambiente e sob determinadas condições, ele se degrada e se transforma nos elementos naturais que o compõe, fechando assim o ciclo de vida natural, sem nenhum tipo de impacto negativo à natureza, independente de estar em um ambiente ideal para a degradação como nas estações de compostagem, ou em aterros ou lixão.

2.3 Biodegradação

Juntamente com a fotólise, a biodegradação é uma das principais formas através das quais os polímeros podem se decompor. A biodegradabilidade é definida como a capacidade que um composto tem em se decompor, principalmente em produtos inócuos, pela ação de organismos vivos, tais como micro-organismos. Neste campo, as bactérias e

os fungos são os principais intervenientes nos processos de biodegradação existentes no mundo natural. A decomposição desses materiais permite-lhes obter precursores para componentes celulares e a energia para os processos internos que a exigem. Alguns polímeros sintéticos podem ser microbiologicamente degradados, no entanto esse processo é normalmente muito lento, e a maioria possui composições químicas resistentes a ataques enzimáticos. Isto já não acontece com os polímeros de origem biológica, muitos dos quais têm propriedades similares às dos polímeros sintéticos (BRAUNEGG *et al.*, 1998).

A velocidade de biodegradação dos PHAs é função de vários fatores, como população microbiana presente no ambiente, temperatura, umidade, pH, nutrientes presentes no meio, cristalinidade, aditivos e área superficial dos polímeros. Estes polímeros são sólidos insolúveis em água, enquanto as depolimerases são enzimas solúveis. Por isso, a degradação acontece através de uma reação heterogênea em duas etapas. A primeira é a de adsorção da enzima na superfície do polímero e a segunda, a de hidrólise das cadeias poliméricas, pelo sítio ativo da enzima. A hidrólise sempre ocorre em uma superfície reacional, entre as enzimas adsorvidas e sítios de adsorção livres (KHANNA & SRIVASTAVA, 2005).

A figura 2.5 representa o biociclo completo de produção e degradação de PHAs. Neste ciclo através da fotossíntese, as plantas utilizam a luz solar, CO₂ e água para produzir carboidratos. Estes na forma de açúcares simples podem ser utilizados como substrato em um processo fermentativo com micro-organismos específicos produzindo PHA que será purificado e processado formando os mais diversos artigos plásticos. Após seu uso, os PHAs podem ser depositados em ambientes microbianos ativos e a biodegradação deste polímero formará CO₂ e água. Uma rota direta através de plantas que produzem PHAs pode ser obtida.

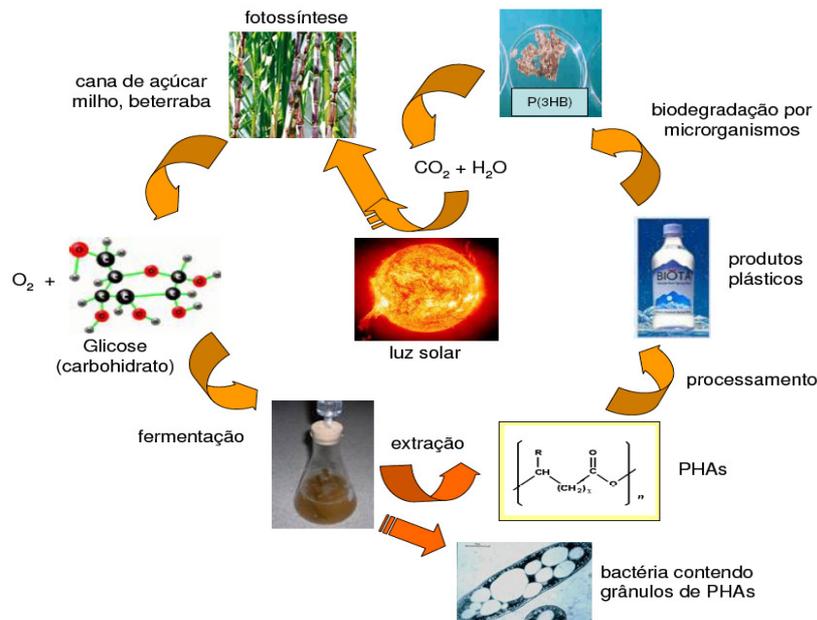


Figura 2.5 - Biociclo dos poli-hidroxicanoatos
 Fonte: GARCIA, 2006.

2.4 Poli-hidroxicanoatos – PHAs

Os poli-hidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres biodegradáveis produzidos por diversas bactérias como materiais de reserva. A observação desta inclusão nas células bacterianas remonta ao pesquisador Beijerinck em 1888, mas o reconhecimento e a primeira determinação da composição dos grânulos de PHAs, só foi identificada por Lemoigne em 1927, no Instituto Pauster, que verificou que em *Bacillus megaterium* a degradação anaeróbica de um material desconhecido, levava à excreção de ácido 3-hidroxi-butírico (VOLOVA, 2004). Lemoigne identificou esse material como um homopolíéster de hidroxiácido, 3-hidroxi-butirato ou poli (3-hidroxi-butirato) (P(3HB)) (BRAUNEGG *et al.*, 1998).

Os PHAs podem ser produzidos por uma grande variedade de micro-organismos procarióticos. São acumulados pela célula microbiana na forma de grânulos (figura 2.6) como substâncias naturais de reserva de carbono e de energia, podendo chegar ao nível de 90 % de seu peso seco (figura 2.7). Estas inclusões são geralmente esféricas, com diâmetros médios de 0,2-0,7 μm , e são circundados por uma membrana composta por cerca de 2 % de proteínas e 0,5 % de lipídios cuja espessura é de 2 nm (MADISON & HUISMAN, 1999; SUDESH *et al.*, 2000). Os grânulos são envoltos por uma camada fosfolipídica, por polimerases, despolimerases e proteínas citosólicas não específicas. A função da monocamada fosfolipídica ainda não está bem estabelecida, embora se suponha

que ela seja necessária para evitar a transição do poliéster do estado amorfo para o estado mais estável - forma cristalina. Supõe-se ainda que ela aja como uma barreira protetora evitando danos celulares causados pela interação de PHAs com estruturas internas ou com proteínas citosólicas (LUENGO *et al.*, 2003).

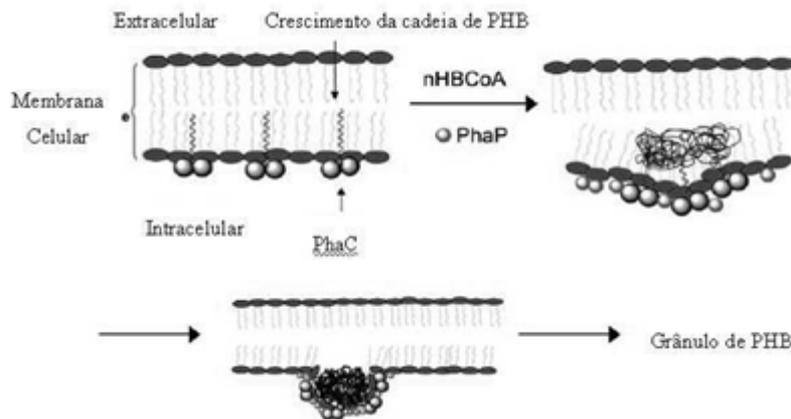


Figura 2.6 - Formação de grânulo de P(3HB) intracelular na membrana lipídica
 Fonte: Adaptado de TIAN *et al.*, 2005.

Em geral, a síntese dos mesmos por bactérias, em um meio nutritivo, ocorre quando há excesso de fonte de carbono e a limitação de pelo menos um nutriente necessário à multiplicação das células, sendo eles: Nitrogênio (N), Fósforo (P), Magnésio (Mg), Ferro (Fe), etc. (STEINBÜCHEL & VALENTIN, 1995; BRANDL *et al.*, 1990).



Figura 2.7 - Células bacterianas contendo grânulos de polímero biodegradável, da família dos poli-hidroxicanoatos (PHA) no seu interior (fotomicrografia eletrônica)
 Fonte: SILVA *et al.*, 2007.

Estes biopolímeros apresentam características muito interessantes como propriedades termoplásticas e físico-químicas muito similares aos vários plásticos de origem petroquímica. São completamente biodegradáveis e biocompatíveis, produzidos a partir de matérias-primas renováveis, podendo ser reciclados e incinerados sem a geração de produtos tóxicos, o que os torna de grande aplicabilidade em relação aos plásticos petroquímicos e possíveis candidatos à sua substituição (BYROM, 1987; HÄNGGI, 1995; STEINBÜCHEL & FÜCHTENBUSCH, 1998).

O termo PHA é aplicado a uma variada família de poliésteres mostrada na tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Estrutura geral dos PHAs para diferentes monômeros
Fonte: LEE, 1996.

$\left[\text{—O—CH—(CH}_2\text{)}_n\text{—C—} \right]_{100-3000}$ <div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center; gap: 20px;"> <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} \\ \text{R} \end{array}$ </div> <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} \\ \text{O} \end{array}$ </div> </div>		
n = 1	R = hidrogênio	Poli (3-hidroxipropionato)
	R = metil	Poli (3-hidroxi butirato)
	R = etil	Poli (3-hidroxivalerato)
	R = propil	Poli (3-hidroxi hexanoato)
	R = pentil	Poli (3-hidroxi octanoato)
	R = nonil	Poli (3-hidroxi dodecanoato)
n = 2	R = hidrogênio	Poli (4-hidroxi butirato)
	R = metil	Poli (4-hidroxivalerato)
n = 3	R = hidrogênio	Poli (5-hidroxivalerato)
	R = metil	Poli (5-hidroxi hexanoato)
n = 4	R = hexil	Poli (6-hidroxi dodecanoato)

Os PHAs têm um alto grau de polimerização, confirmado pelas altas massas molares, sendo que com o aumento do comprimento da cadeia, ou aumento do número de monômeros no copolímero sua elasticidade aumenta (REDDY *et al.*, 2003; KHANNA & SRIVASTAVA, 2004). Estes polímeros bacterianos apresentam massa molecular suficientemente alta que proporciona ao polímero características poliméricas similares aos plásticos convencionais, como o polipropileno (MADISON & HUISMAN, 1999; REDDY *et al.*, 2003). A massa molecular destes compostos varia de 2×10^3 a 3×10^6 g.mol⁻¹, dependendo do micro-organismo produtor e das condições de crescimento (KIM *et al.*, 1992; MADISON & HUISMAN, 1999; KHANNA & SRIVASTAVA, 2004).

Os PHAs são considerados altamente cristalinos, com um grau de cristalinidade variando entre 55 a 80 %, sendo que a fragilidade do polímero aumenta com o grau de cristalinidade (STEINBÜCHEL, 1996; MADISON & HUISMAN, 1999; KHANNA & SRIVASTAVA, 2004). Propriedades físicas e mecânicas, como rigidez, ductilidade, ponto de fusão, temperatura de transição vítrea e resistência a solventes orgânicos variam consideravelmente, em função da composição monomérica e da sua aplicabilidade, variando do fortemente cristalino ao elástico (KHANNA & SRIVASTAVA, 2004). São termoplásticos não-tóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis, que podem ser produzidos de fontes renováveis ou ainda de resíduos.

2.5 Poli (3-hidroxiacetato) – P(3HA)

O poli (3-hidroxiacetato) (P(3HA)) é um poliéster pertencente à família dos poli-hidroxiácidoalcanóides, constituído por monômeros de 3-hidroxiacetato (conforme figura 2.8). MADIGAN *et al.* (2000) afirmam que é o PHA mais bem caracterizado e acumulado com maior frequência por bactérias com predominância da bactéria *Ralstonia eutropha*, atualmente, *Cupriavidus necator*. A biossíntese deste polímero permite um processo cíclico sustentável através de fontes renováveis, além disso, sua biodegradação gera CO₂ e água por uma enorme quantidade de fungos e bactérias em um curto espaço de tempo.

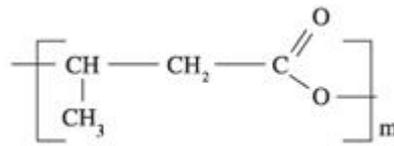


Figura 2.8 - Estrutura molecular do poli (3-hidroxiacetato)

O P(3HA) apresenta resistência aos raios ultravioleta (UV) superior ao polipropileno e também excelente impermeabilidade ao O₂ e à água, tornando-se adequado para o uso na confecção de embalagens alimentícias (HOLMES, 1985; WEINER, 1997; GROTHE *et al.*, 1999; citados por FARIAS, 2009).

O ponto de fusão do P(3HA) é próximo da temperatura na qual se inicia sua degradação, aproximadamente 180°C, dificultando os processos de modelagem por injeção ou sopro (POIRIER *et al.*, 1995). As propriedades mecânicas como módulo de Young e tensão de cisalhamento são semelhantes às do polipropileno, no entanto sua resistência à ruptura (5 %) é nitidamente inferior à do polipropileno (400 %). Assim, o P(3HA) é um material mais rígido que se torna frágil quando estocado por um período de vários dias sob condições ambientes, podendo limitar sua aplicabilidade (KHANNA & SRIVASTAVA, 2004; HOLMES 1985; LEE, 1996a citados por FARIAS, 2009). Contudo, o polímero P(3HA) pode ser usado como matéria-prima principalmente naqueles setores em que características como pureza e biodegradabilidade são necessárias. Ele pode ser usado na fabricação de embalagens para produtos de limpeza, higiene, cosméticos e produtos farmacêuticos. Também serve para produzir sacos e vasilhames para fertilizantes e defensivos agrícolas, vasos para mudas e produtos injetados, como brinquedos e material escolar. Além disso, por ser biocompatível e facilmente absorvido pelo organismo humano, pode ser empregado na área médico-farmacêutica, prestando-se à fabricação de fios de sutura, próteses ósseas e cápsulas que liberam gradualmente medicamentos na corrente

sanguínea. Graças às propriedades de barreira a gases, o bioplástico pode ainda ser usado em embalagens de alimentos de papel cartonado do tipo “longa vida” para o envase de sucos naturais, leite pasteurizado e bebidas isotônicas (PACIFIC DAYLIGHT TIME, 2004 citado por DELGADO, 2006).

2.6 Organismos produtores de PHAs

Os agentes biológicos responsáveis pela transformação de substratos em poli-hidroxicanoatos são geralmente as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que podem ser encontradas na natureza, isto é, no solo, água do mar, efluentes, etc. (BYROM, 1987). LEE (1996) aponta que os mesmos podem ser divididos em dois grupos, baseados nas condições de cultura requeridas para a síntese do polímero. O primeiro grupo de micro-organismos requer a limitação de um nutriente essencial como N, P, Mg, K, O ou S para a eficiente síntese de PHA, paralelamente ao excesso da fonte de carbono. Desse grupo fazem parte *Cupriavidus necator*, *Protomonas extorquens*, *Pseudomonas oleovorans* entre muitos outros. O segundo grupo de micro-organismos não requer a limitação de nutriente para a síntese de polímero, acumulando-o durante o crescimento. Estão incluídos neste grupo, *Alcaligenes latus*, *Azobacter vinelandii* recombinante e *Escherichia coli* recombinante. De acordo com NETTO (2011), o Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), ligado ao governo do Estado de São Paulo, identificou uma nova bactéria, a *Burkholderia sacchari*, isolada em solo de plantação de cana-de-açúcar, que também produz esse tipo de bioplástico.

2.7 *Cupriavidus necator*

Cupriavidus necator, uma espécie de micro-organismo procariótico, do tipo gram-negativo, encontrado naturalmente no solo e água, anteriormente recebia as denominações de: *Hydrogenomonas eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha*. Esta espécie possui células na forma de bastonete, é móvel, tendo de 1 a 4 flagelos peritriquiais. Na fase estacionária de crescimento, ou seja, no acúmulo de polímero, as células podem se tornar esféricas (BRAUNEGG *et al.*, 1998). A figura 2.9 apresenta a bactéria em fase de crescimento e em fase de acúmulo de polímero.

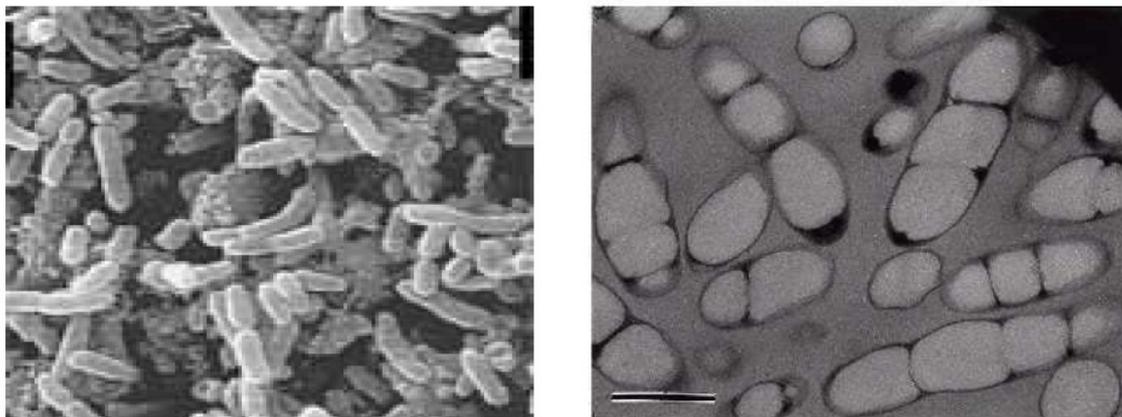


Figura 2.9 - *Cupriavidus necator* em fase de crescimento; e fase de produção
 Fonte: AMPE, 1995; SUDESH *et al.*, 2000.

Segundo TANAKA *et al.* (1994) citado por FIORESE (2008), essa bactéria produz um polímero de alta massa molar, utilizando uma variedade de compostos orgânicos como fonte de carbono, entre os quais estão incluídos glicose, frutose, formiato, acetato, propionato, lactato, glutamato, succinato, fenobenzoato, entre outros. Pode crescer autotroficamente em atmosfera de gases H_2 , O_2 e CO_2 .

A literatura cita temperaturas ótimas de crescimento entre 30 - 34°C (MARANGONI, 2000; GROTHE *et al.*, 1999), e a maioria dos estudos são realizados a 30°C. Contudo, de acordo com um estudo comparativo para síntese celular e produção de polímero, desenvolvido por FIORESE (2008), 35°C é a temperatura que favorece o crescimento desta bactéria conforme figura 2.10.

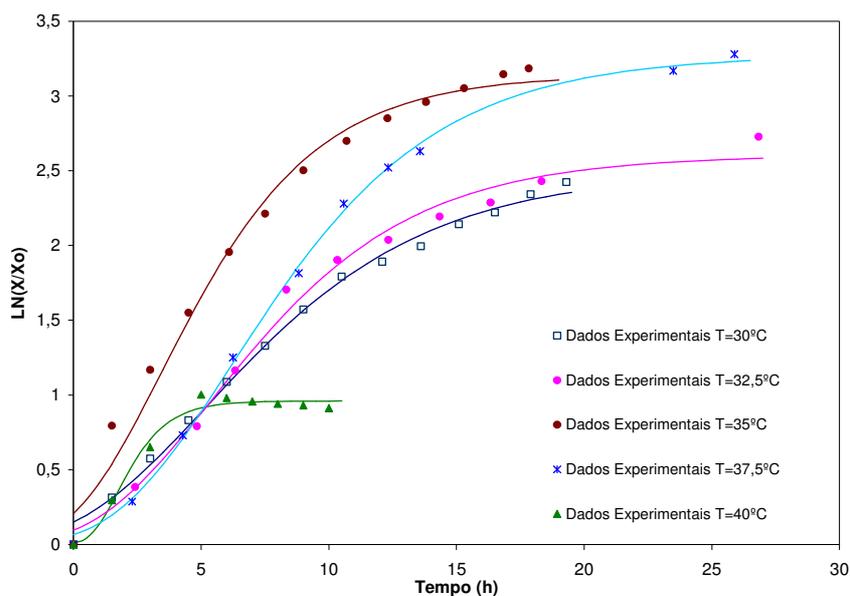


Figura 2.10 - Curvas de crescimento de *C. necator* em glicose expressa em LN (X/X_0) pelo tempo (h) nas temperaturas de 30°C, 32,5°C, 35°C, 37,5°C e 40°C. As linhas representam o modelo de Gompertz Modificado ajustado aos dados experimentais
 Fonte: FIORESE, 2008.

Estudos realizados posteriormente ao trabalho de FIORESE (2008) obtiveram excelentes resultados em cultivos também realizados a 35°C, como FARIAS (2009) que obteve valores de $\mu_{\text{máx}}$ 0,1907 h⁻¹, IENCZAK (2011) 0,19 h⁻¹, entre outros como QUINES (2010).

GOMEZ *et al.* (1997) em seus estudos obtiveram que o pH ideal tanto para o crescimento como o acúmulo de bactérias produtoras de P(3HB), é da ordem de 7,0.

O acúmulo de PHA, na forma de grânulos, em *C. necator*, geralmente ocorre quando existe excesso de fonte carbono e limitação de algum nutriente essencial à sua multiplicação. Esta síntese ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, procura-se favorecer ao máximo o crescimento celular e assegurar, ao mesmo tempo, que a síntese do polímero seja a menor possível. Na segunda etapa, o processo é feito inversamente, interrompe-se o crescimento celular e estimula-se ao máximo o acúmulo do polímero no interior da célula (GOMEZ & BUENO NETTO, 1997). Entretanto, FIORESE (2008) salienta que o biopolímero pode sofrer degradação intracelular ocorrendo, via de regra, em condições de cultura opostas àquelas onde se observa o seu acúmulo, ou seja, em situações onde haja pouca disponibilidade da fonte de carbono, e não haja limitação de outras necessidades nutricionais.

A figura 2.11 mostra a evolução do crescimento e de acúmulo de polímero P(3HB) ao longo de 24 h de cultivo.

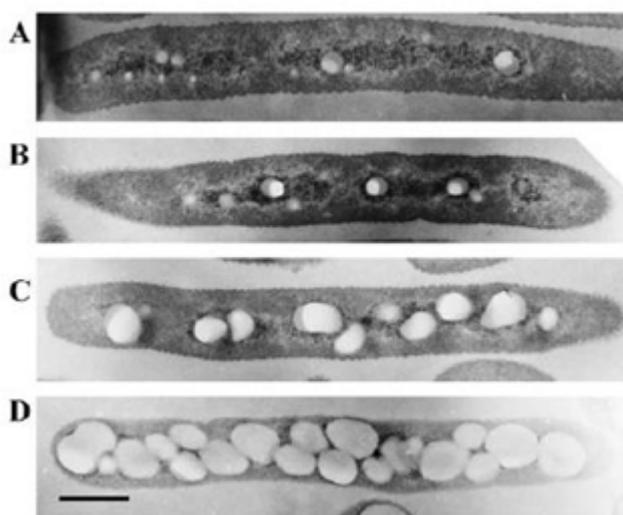


Figura 2.11 - Microscopia de elétrons de transmissão (TEM) de *C. necator* na produção de P(3HB) 2,5 h (A), 5 h (B), 9 h (C) e 24 h (D), mostrando o "desaparecimento" dos elementos de mediação escuro-manchados dando espaço aos grânulos intracelulares de P(3HB). O tamanho final dos grânulos de P(3HB) após 24 h é de 0,5 μm

Fonte: TIAN *et al.*, 2005.

Por possuir elevados rendimento e velocidade de produção, o *Cupriavidus necator* tem sido o micro-organismo mais utilizado na produção industrial de polímeros (RAMSAY *et al.*, 1990), além de acumular cerca de 80 % de sua massa seca em polímero também pode utilizar fontes renováveis de carbono. Dentre os substratos de baixo custo, metabolizados por *C. necator* na produção de P(3HB), podem-se enfatizar subprodutos agroindustriais como cana-de-açúcar (KULPREECHA *et al.*, 2009), bagaço de maçã (RODRIGUES, 2005b), soro de leite (MARANGONI *et al.*, 2002), hidrolisado de amido (DALCANTON *et al.*, 2010), melação cítrica (FIORESE, 2004), entre outros.

2.8 Metabolismo do *Cupriavidus necator* – Síntese do P(3HB)

O processo de produção de P(3HB) utilizando *C. necator* é realizado por cultivos caracterizados pela existência de duas fases: uma primeira fase, onde se emprega um meio contendo substratos como açúcares e nutrientes essenciais para o crescimento sem haver limitações; e uma segunda fase onde o meio deve conter excesso de fonte de carbono e apresentar uma carência ou limitação nutricional preferencialmente em fontes de nitrogênio, capaz de direcionar o metabolismo das bactérias para a síntese e acúmulo do biopolímero.

De acordo com SPEECE (1996) citado por LAMAISON (2009), dentre os nutrientes adicionados para atender às necessidades de desenvolvimento do micro-organismo estão o nitrogênio (N) e o fósforo (P) que são essenciais para o crescimento bacteriano.

O nitrogênio desempenha um papel particularmente importante, pois todos os organismos vivos necessitam dele para formar as suas proteínas; por outro lado, o excesso deste elemento pode provocar toxicidade do substrato pela produção de amoníaco (HANSEN *et al.*, 1998).

Conforme citado por OLIVEIRA & NOGUEIRA (1984), o enxofre é necessário para a síntese de aminoácidos e o fósforo é encontrado nos ácidos nucleicos, fosfolipídios e ATP. No processo de digestão anaeróbia, o enxofre é ainda menos importante do que o fósforo. A quantidade presente no substrato deve por isso ser limitada, para evitar um desenvolvimento acentuado das bactérias redutoras de sulfato e conseqüente transformação do enxofre em sulfureto de hidrogênio.

O potássio (K), o cálcio (Ca), o magnésio (Mg) e o ferro (Fe) são elementos necessários para manter a atividade enzimática do processo e também como constituintes de complexos metálicos.

Os mesmos autores ainda colocam outro fator a ter em conta, que são os teores de metais pesados e de produtos tóxicos que podem originar a morte de micro-organismos metanogênicos. Quantidades excessivas de amoníaco dissolvidas nos excrementos líquidos também podem inibir o cultivo. Torna-se, por isso necessário efetuar uma diluição, principalmente dos produtos com elevado teor de nitrogênio.

Os monossacarídeos, glicose e frutose são açúcares redutores por possuírem grupo carbonílico e cetônico livres, os quais são facilmente metabolizados pelo *C. necator*. A via de degradação destes carboidratos é a via *Entner-Doudoroff*, mais frequentemente utilizada por este micro-organismo e leva à formação de piruvato, o qual é oxidativamente descarboxilado a acetil coenzima A (acetil-CoA).

Desta forma, a fase de crescimento celular é composta por duas fases: lag e log. A fase lag, de adaptação interna da célula ao novo meio de cultura, corresponde à indução das enzimas necessárias para metabolizar os nutrientes. A síntese de RNA é iniciada logo no início do contato da célula com o novo meio, a síntese de proteínas após alguns minutos. Em seguida, são iniciadas as sínteses de polissacarídeos e de fosfolipídeos, que permitirão aumentar o volume celular e a massa da célula. A síntese de DNA ocorre somente no final da fase lag. A biomassa é constante ($X_t = X_0$). Já a fase log, correspondente ao crescimento logarítmico das células, onde nenhum fator externo ou componente do meio é limitante para o crescimento microbiano, é constituída por células plenamente adaptadas, absorvendo os nutrientes, sintetizando seus constituintes, crescendo e se duplicando. A velocidade de crescimento μ é dada por dX/dt , sendo constante (USP, 2009).

As condições sob as quais a síntese de proteínas cessa e as células iniciam os processos de síntese e acúmulo de P(3HB) são determinadas pelo estado redox do citoplasma e pela concentração intracelular de piruvato e CoA disponível (SENIOR & DAWES, 1971). Durante o crescimento balanceado, o piruvato e os equivalentes redutores (NADH e NADPH) são geralmente despendidos no ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA), sendo terminalmente oxidado a CO_2 para formação de aminoácidos e geração de energia na célula, na forma de ATP. O nível de CoA disponível permanece alto, o qual dificulta a

síntese do P(3HB). Em condições de crescimento desbalanceado, limitação de algum nutriente essencial ao crescimento, o piruvato não entra no TCA, mas é descarboxilado, formando acetil-CoA. Assim, o nível de CoA disponível é reduzido, o qual favorece a ativação do ciclo de enzimas que sintetizam o P(3HB) (BRAUNEGG *et al.*, 1998; VOLOVA, 2004).

O P(3HB) é sintetizado em *C. necator* e em muitos micro-organismos, a partir do acetil-CoA, em condições de excesso da fonte de carbono e limitação de algum nutriente essencial, por uma sequência de 3 reações catalisadas pelas enzimas 3- β -cetotiolase, acetoacetil-CoA redutase e PHA sintase (OEDING & SCHLEGEL, 1973 citado por SQUIO, 2003).

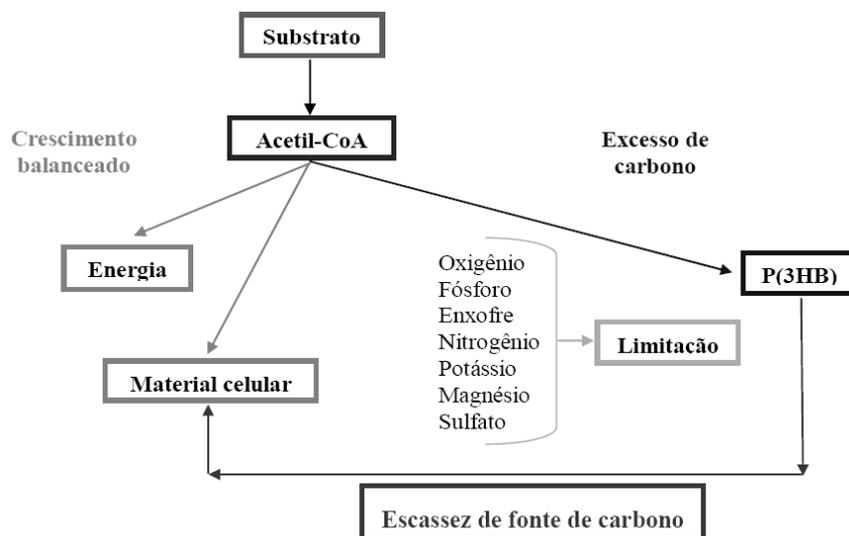


Figura 2.12 - Produtos do acetil-CoA em condições de crescimento balanceado e de excesso e escassez de carbono
 Fonte: SQUIO, 2003.

A primeira enzima, β -cetotiolase, condensa, reversivelmente, duas moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA. Esta molécula é então reduzida, através da ação da enzima acetoacetil-CoA redutase NADPHdependente, à R-3-hidroxi-butiril-CoA, que é incorporado à cadeia de polímero pela ação da enzima PHA sintase (SUDESH *et al.*, 2000). A rota de produção e degradação de P(3HB) é intracelular por *C. necator* podendo ser melhor visualizada na figura 2.13.

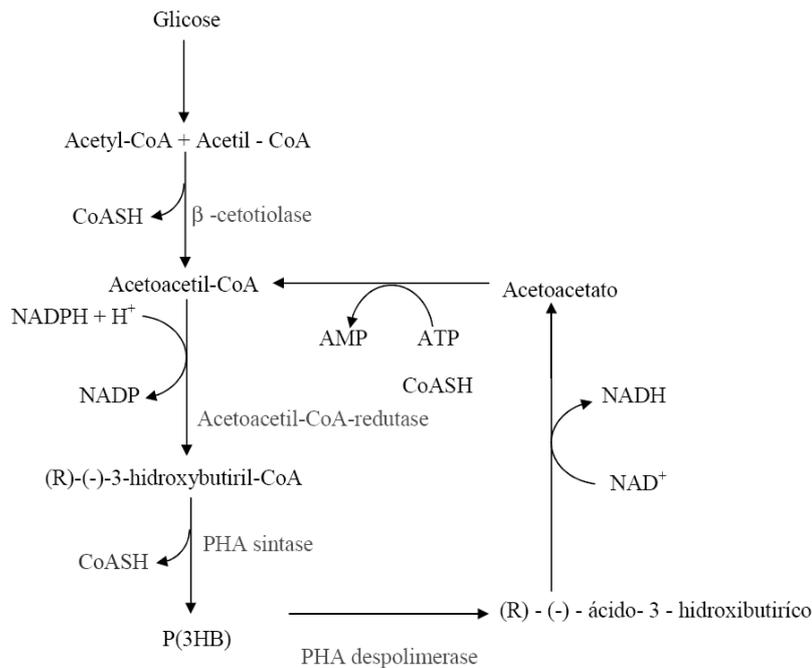


Figura 2.13 - Síntese de P(3HB) a partir de acetil-CoA em *C. necator*
 Fonte: RODRIGUES, 2002.

2.9 Suplementos nutricionais – Resíduos das indústrias processadoras de alimentos e matéria prima renovável

Uma avaliação econômica do processo de produção de P(3HB) indica que o custo do substrato tem uma contribuição importante no custo global da produção, podendo representar mais de 38%, segundo CHOI & LEE (1999).

O alto custo de produção de PHAs pode ser minimizado usando resíduos orgânicos de baixo custo provenientes de indústrias processadoras de alimentos.

O termo resíduo é utilizado em sentido amplo, englobando não somente sólidos como também os efluentes líquidos e os materiais presentes nas emissões atmosféricas. O resíduo industrial, depois de gerado, necessita de destino adequado, pois não pode ser acumulado indefinidamente no local em que foi produzido. A disposição dos resíduos no meio ambiente, por meio de emissões de matéria e de energia lançados na atmosfera, nas águas ou no solo deve ocorrer após os resíduos sofrerem tratamento e serem enquadrados nos padrões estabelecidos na legislação ambiental para não causarem poluição (PELIZER *et al.*, 2007).

Além de criar potenciais problemas ambientais, os resíduos representam perdas de matérias-primas e energia, exigindo investimentos significativos em tratamentos para controlar a poluição. A indústria de alimentos produz ao longo de sua cadeia uma grande

quantidade de resíduos agroindustriais, o que gera perda de divisas. Segundo LAUFENBERG *et al.* (2003) citado por PELIZER *et al.* (2007), os resíduos podem conter inúmeras substâncias de alto valor. Se for empregada uma tecnologia adequada, este material pode ser convertido em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários. Numerosas substâncias relacionadas ao processo de produção de alimentos são adequadas para separação e reciclagem.

De acordo com PANDEY *et al.* (2000), houve um crescente interesse na biotransformação de resíduos, tendo em vista, serem materiais de baixo custo e altamente renováveis. Deste modo, a utilização de resíduos, além de diminuir o impacto sobre o meio ambiente, devido à disposição inadequada, pode ser um fator importante para a produção de subprodutos e diminuição nos custos de produção.

Conforme PELIZER *et al.* (2007), a preocupação com o meio ambiente leva à viabilização de projetos que levam à sustentabilidade do sistema de produção industrial. A indústria de alimentos produz uma série de resíduos com alto valor de (re) utilização. Inúmeros estudos utilizando resíduos industriais do processamento de alimentos têm sido realizados com objetivo de aproveitamento destes. Com isso, minimiza-se o impacto ambiental destes tipos de indústrias na região onde estão situadas e ainda agrega-se valor aos sub-produtos gerados.

Muitos países entre eles o Brasil estão realizando estudos de gerenciamento e diminuição do volume de lixo sólido, buscando ainda a produção de materiais plásticos biodegradáveis, a partir de fontes renováveis de carbono. Estes novos materiais devem possuir as propriedades desejáveis dos plásticos convencionais, serem produzidos a partir de substratos renováveis e ainda serem completa e rapidamente biodegradados quando descartados no meio ambiente (LEE *et al.*, 2002; HUANG & EDELMAN 1995; FRANCHETTI & MARCONATO, 2006).

De acordo com IENCZAK (2006), as fontes de carbono renováveis na produção de PHAs são principalmente originadas de subprodutos de agroindústrias. Essas fontes são os principais componentes da DBO e DQO nas estações de tratamento de efluentes (ETE) de agroindústrias e, portanto, uma forma de solucionar ambos os problemas de redução de custos na produção de PHAs e nas ETEs está no uso destes subprodutos como substrato principal para a produção biotecnológica de PHAs. Quando se observam trabalhos que reportam o uso de fontes renováveis de carbono para a produção de PHAs, sem o objetivo

de produzir alta densidade celular, destacam-se o uso de melão cítrico (FIORESE, 2004), hidrolisado de amido (DALCANTON *et al.*, 2010), soro de leite (MARANGONI *et al.*, 2002), sementes de jaca em pó, mandioca em pó, farelo de trigo, torta de óleo de gergelim, torta de óleo de amendoim e farinha e milho (RAMADAS *et al.*, 2009), lodo ativado de indústria processadora de alimentos (KUMAR *et al.*, 2004) entre outras.

2.9.1 Resíduo amiláceo (bagaço hidrolisado)

A mandioca (*Manihot esculenta Crantz*), também conhecida por aipim e macaxeira é uma cultura amplamente difundida por todo território nacional, sendo um dos principais alimentos de milhões de pessoas de países tropicais, inclusive o Brasil. É cultivada em todo o território brasileiro, com exceção do sul do Rio Grande do Sul, região muito fria para o desenvolvimento desta cultura (KOLICHESKI, 1995).

No Brasil, as indústrias de mandioca são conhecidas pela obtenção de produtos amiláceos. Nas casas de farinha, a mandioca é transformada em farinha e, nas fecularias extraem da mandioca a fécula – polvilho doce. A partir da fécula, pode-se obter ainda, por fermentação, o polvilho azedo.

No processo de produção do amido ou fécula, grande quantidade de resíduo sólido (bagaço) e líquido (manipueira) são eliminados nas etapas de prensagem, peneiramento e centrifugação.

A toxicidade da mandioca e de seus derivados é medida pela quantidade de ácido cianídrico total (livre e combinado) que determinada amostra é capaz de liberar. Conseqüentemente, os resíduos caracterizam-se por conter elevada carga orgânica solúvel (DQO) e alguns sólidos insolúveis ou em suspensão, além da presença de glicosídeo hidrolisável a cianeto que apesar da pequena quantidade levando-se em consideração a diluição, permanece na forma de ácido cianídrico aumentando o seu potencial poluidor. Todos os resíduos gerados durante o processamento da mandioca, nas pequenas indústrias, são normalmente descartados para o meio ambiente, muitas vezes, sem o devido tratamento. Além do aspecto de agressão ao meio ambiente, deve ser considerado também que o despejo indevido dos subprodutos de mandioca constitui em perda de rendimentos para o produtor, quando se consideram as quantidades e composição das águas geradas na produção (CEREDA, 2001).

Os resíduos da industrialização da mandioca podem ser aproveitados das mais diferentes formas: na alimentação animal de bovinos, suínos e aves; para a produção de proteína microbiana, fibras dietéticas e bio-produtos fermentados, como substrato microbiano; na produção de vitaminas, verme-compostagem, fertilizantes, biofertilizante, inseticidas, herbicidas e fertirrigação (NORMANHA, 1982).

De acordo com BUTRIAGO (1990), o bagaço de mandioca pode representar entre 10 e 20 % do peso das raízes de mandioca utilizadas para a produção do amido, sendo que o mesmo pode conter até 60 % de amido, ABRAHÃO (2005) ainda evidencia que uma fecularia que processa, em média, 200 toneladas de mandioca por dia, gera, aproximadamente, 183 toneladas por dia de bagaço, com 15 % de matéria seca; 73 % de amido; e, 15 % de fibras na matéria seca.

Segundo CEREDA (1994) o resíduo úmido da fecularia obtido após a extração do amido caracteriza-se por baixos teores de matéria seca e proteína bruta e elevados teores de fibras, e até 75 % de amido residual, caracterizando-se como um alimento energético.

Entretanto, determinados micro-organismos não possuem capacidade de utilizar o amido como fonte de carbono. Para tanto, antes do processo fermentativo, o amido sofre uma hidrólise à glicose (KIM, 2000).

DALCANTON (2006) utilizou resíduo amiláceo em seus experimentos desenvolvidos a 30 e 35°C com *C. necator*, e o mesmo mostrou-se uma boa fonte de carbono para a produção de P(3HB).

2.9.2 Soro de queijo

A indústria queijeira representa um importante segmento do setor lácteo com 33,7 % na participação da produção nacional de leite (NEVES, 2005) e uma demanda total média de 10 litros de leite por quilo de queijo produzido. De acordo com ABIQ (2011), a produção anual de queijo no Brasil é de aproximadamente 350.000 toneladas por ano, gerando 3,5 milhões de t de soro de queijo.

Dentre os subprodutos da indústria de laticínios, o soro é o constituinte de maior importância e pode ser definido como a fração aquosa do leite que é separada da caseína durante a produção de queijos, correspondendo a cerca de 90 % do volume do leite,

dependendo do tipo de queijo processado (FURTADO & LOURENÇO NETO, 1994; CAMARGO *et al.*, 2000).

Segundo PAOLUCCI (1991) aproximadamente 80 % do volume do leite destinado à fabricação de queijos se transforma em soro. Os sólidos do soro representam 50 a 55 % dos sólidos totais do leite. De modo geral, o soro é rico em proteínas, lactose, minerais e vitaminas (KOSIKOWSKI, 1979; DUARTE & MÍDIO, 1997 citados por TEIXEIRA & FONSECA, 2008).

Em virtude do tratamento desse grande volume de soro gerado, com alta carga poluidora devida a altíssima DBO, ser muito caro, a grande maioria dos laticínios acabam descartando o efluente em corpos receptores o que pode causar um grave problema ambiental. Além disso, PONSANO *et al.* (1992) afirmam que se o descarte do soro de leite for realizado diretamente no solo, a estrutura físico-química do mesmo pode ser comprometida e com isso, pode haver a diminuição do rendimento da colheita em áreas agrícolas.

Várias opções para o aproveitamento do soro podem ser utilizadas, desde o uso como matéria-prima na elaboração de bebidas lácteas, até a utilização de modernas tecnologias para obtenção de produtos específicos e/ou novos a serem utilizados principalmente pelas indústrias alimentícias (COTON, 1985; CHIAPPINI *et al.*, 1995; FERREIRA, 1997 citados por TEIXEIRA & FONSECA, 2008).

De acordo com GABARDO (2011), a composição nutricional do soro de queijo permite sua aplicação em diversos bioprocessos. Nesse contexto, pesquisas que utilizam este subproduto como substrato alternativo vem sendo constantemente realizadas, tais como aquelas que visam à obtenção de enzimas (RECH & AYUB, 2006; ORNELAS *et al.*, 2008), biogás (ANTONOPOULOU *et al.*, 2008; NAJAFPOUR *et al.*, 2010), ácidos orgânicos (PANESAR *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2006), polissacarídeos (MESOMO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009) além de etanol (SILVEIRA *et al.*, 2005; LEWANDOWSKA & KUJAWSKI, 2007), entre outros bioprodutos.

MARANGONI (2000) com o objetivo de reduzir o custo de produção de PHA por *C. necator*, estudou a utilização de soro de leite como única fonte de carbono, obtendo valor da velocidade específica máxima de crescimento de $0,20 \text{ h}^{-1}$, o que representou uma boa alternativa para a sua utilização como fonte de carbono.

2.9.3 Óleos vegetais

A soja é um grão muito versátil que dá origem a produtos e subprodutos muito usados pela agroindústria, indústria química e de alimentos. Seu uso mais conhecido, no entanto, é como óleo refinado, obtido a partir do óleo bruto.

De acordo com TSUTSUMI (2004), a soja é a única oleaginosa com boa fonte de óleo de alta qualidade (20 %) e proteína (40 %), além de ser rica em açúcares, glicídeos e vitaminas. O óleo de soja corresponde, em média, a 20 % da matéria seca dos grãos de soja. Com baixa taxa de óleos saturados, é composto por excelentes fontes de ácidos graxos essenciais: linoléico (50 %) e linolênico (7 %), além de oléico (24 %) e tocoferol (vitamina E).

Recentemente, a soja vem crescendo também como fonte alternativa de combustível. Mesmo assim na atualidade existe um excedente de 232 mil toneladas de óleo de soja no Brasil (ABIOVE, 2011). E segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2011) existe a previsão de que a produção de grão de soja seja ampliada, em que será feita uma integração do cultivo de soja com a pecuária.

A região Sul do país destaca-se pela quantidade produzida de grãos, principalmente no Estado do Paraná sendo este o principal produtor do país de oleaginosa.

Estudos já realizados visando a redução nos custos de produção de PHAs foram desenvolvidos com o uso de óleos vegetais, os quais são produtos agrícolas renováveis e de baixo custo. Estes estudos mostram que os óleos dependendo do micro-organismo podem ser usados como fonte de carbono principal ou como suplemento nutricional.

FUKUI & DOI (1998) verificaram a capacidade de *C. necator* crescer e produzir PHAs a partir de óleos vegetais como óleo de oliva, de milho, de palma e ácido oléico como únicas fontes de carbono. Os resultados mostraram que a bactéria cresceu muito bem nesses substratos, acumulando alto teor de P(3HB), entre 79 – 82 % de sua massa seca.

SQUIO & ARAGÃO (2004) estudaram a utilização de óleos vegetais como suplementos. Os ácidos oléico e linoléico fazem parte da composição de muitos óleos vegetais que são substratos de custo mais baixo que os ácidos graxos puros. Os resultados obtidos foram que o uso de óleos vegetais como suplementos nutricionais na produção de P(3HB) por *C. necator* levaram a um aumento na produção do biopolímero. As melhores alternativas de substituição do ácido oléico foram os óleos de canola e oliva.

RODRIGUES (2005b) também obteve maior conteúdo de P(3HB) com meio suplementado em óleo de soja, cerca de 10,7 % a mais que o meio sem suplementação, como da mesma forma foi observado por DALCANTON (2006), que obteve 11,7 e 13,7 % a mais em 30°C e 35°C, respectivamente. A produtividade obtida por RODRIGUES (2005b) foi aumentada de 0,22 g.L⁻¹.h⁻¹ para 0,49 g.L⁻¹.h⁻¹.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização dos resíduos utilizados como suplementos

Os resíduos, soro de queijo e bagaço de mandioca, foram cedidos pelas empresas Laticínio Lacto Mesa e Fecularia Zadimel de Toledo/PR, respectivamente. Os mesmos foram caracterizados nos laboratório de Controle de Poluição do curso de Engenharia Química da UNIOESTE – Campus Toledo e no Grupo de Pesquisas em Recursos Pesqueiros e Limnologia – GERPEL da UNIOESTE – Campus Toledo.

Uma vez que, o bagaço de mandioca encontra-se em estado sólido e na forma de fonte de carbono amido, o mesmo passou por um processo de hidrólise ácida e aquecimento antes de iniciar-se a caracterização, de forma a obter um hidrolisado de bagaço de mandioca (hidrolisado amiláceo) com disponibilidade de fonte de carbono glicose, este procedimento é necessário em virtude da bactéria *Cupriavidus necator* não possuir a capacidade de assimilar o amido como fonte de carbono, sendo necessário hidrolisar o amido presente no bagaço de mandioca para obtenção de glicose.

Hidrólise do bagaço de mandioca

A hidrólise do bagaço de mandioca foi realizada de acordo com estudos de KRUEGER (2009), através da adição de HCl (10 %) em 300 g.L⁻¹ de resíduo, na proporção de 1:10 (ácido:solução) e aquecimento em autoclave a 121°C por 30 minutos. Após, filtrou-se à vácuo para separação dos sólidos e deixou-se resfriar, a solução obtida foi neutralizada com adição de NaOH (40 %). Obtendo-se então o hidrolisado amiláceo usado nos experimentos.

A caracterização do hidrolisado amiláceo e do soro de queijo foi feita através da aplicação das metodologias de análise, descritas a seguir.

3.1.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi feita em pHmetro digital marca TECNOPON, modelo MPA-210.

3.1.2 Determinação da alcalinidade e acidez

A determinação de alcalinidade e acidez foi realizada conforme descrito nas normas analíticas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985), descritas nos ANEXOS 01 e 02.

3.1.3 Determinação dos sólidos totais e sólidos totais voláteis

A metodologia utilizada para a determinação de sólidos totais e sólidos totais voláteis foi conforme procedimento descrito no *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005) (ANEXO 03).

3.1.4 Determinação de açúcares redutores

A quantificação de açúcares redutores foi determinada utilizando-se o método colorimétrico 3,5-Dinitrosalicílico (DNS), descrito por MILLER (1959) (ANEXO 04).

3.1.5 Determinação da demanda química de oxigênio (DQO)

A metodologia utilizada para determinação de DQO foi conforme procedimento descrito no *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005) (ANEXO 05).

3.1.6 Determinação da demanda bioquímica de oxigênio (DBO)

A DBO foi determinada pelo laboratório GERPEL - UNIOESTE através da metodologia de diluição e incubação a 20°C - 5 dias (APHA, 2005) (ANEXO 06).

3.1.7 Determinação de nitrogênio total

O nitrogênio total foi determinado pelo laboratório GERPEL - UNIOESTE pelo método Kjeldahl, descrito em MACKERETH *et al.* (1978) (ANEXO 07).

3.1.8 Determinação de fosfato total

O fosfato total foi determinado no laboratório GERPEL - UNIOESTE descrito em MACKERETH *et al.* (1978).

3.2 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi a bactéria mutante *Cupriavidus necator* DSM 545. A cepa foi doada pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A mesma foi mantida sob refrigeração em tubos contendo meio ágar nutriente (NA) composto de 5,0 g.L⁻¹ de peptona de carne, 3,0 g.L⁻¹ de extrato de carne e 1,5 % de ágar, com repiques periódicos a cada 15-30 dias.

3.3 Meios de cultura

Meio de Propagação (Primeira pré-cultura)

A ativação do micro-organismo *Cupriavidus necator*, foi realizada em caldo nutriente (*Nutrient Broth* – Difco) (NB). O mesmo é constituído de 5,0 g.L⁻¹ de peptona de carne, 3,0 g.L⁻¹ de extrato de carne.

Meio Mineral (Segunda pré – cultura)

O meio mineral (MM), determinado por ARAGÃO (1996), adaptado por IENCZAK (2011), foi utilizado como segunda pré-cultura (sem limitação de nitrogênio), conforme composições apresentadas nas tabelas 3.1 e 3.2.

Tabela 3.1 - Composição do meio mineral sem limitação em nutrientes

	Componente	Solução Conc. (g.L ⁻¹) ^a	Volume adicionado (mL.L ⁻¹ de meio)	Conc. no meio
Solução 1 – Nutrientes	Citrato de amônio e ferro III	10,0	6,0	0,06 g.L ⁻¹
	Sulfato de magnésio	50,0	10,0	0,50 g.L ⁻¹
	Cloreto de cálcio	5,0	2,0	0,01 g.L ⁻¹
	Ureia	200,0	11,35	2,27 g.L ⁻¹
	Ác. nitrilotriacético	19,1	10,0	0,19 g.L ⁻¹
	Elementos traço ^b Água destilada ^c		1,0	1,00 mL.L ⁻¹
Solução 2 – Fonte de fosfato	Fosfato de potássio	122,4	3,56	0,44 g.L ⁻¹
Solução 3 - Fonte de carbono ^d	Glicose	20,0		40,00 g.L ⁻¹
	Frutose	20,0		

^a concentrações das soluções estoque.

^b a composição da solução concentrada de elementos traço é demonstrada na tabela 3.2.

^c o volume de água é calculado em função do volume de soluções adicionadas ao meio.

^d a composição da fonte de carbono depende do estudo realizado.

Tabela 3.2 - Composição da solução concentrada de elementos traço

Elemento	Conc. (g.L ⁻¹)
H ₃ BO ₃	0,30
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,20
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,10
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,03
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,03
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,02
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01

Cada uma das soluções (1, 2 e 3) apresentadas na tabela 3.1, foi preparada separadamente e armazenada como solução estoque. O pH da solução 1 foi ajustado a 7,0 com NaOH (40 %). Em seguida, as soluções 1, 2 e 3 foram autoclavadas separadamente durante 15 minutos a 121°C e adicionadas asépticamente de forma manual.

Cultivos de crescimento (planejamento experimental) e cultivos com limitação de nitrogênio e maior quantidade de suplementos (demais experimentos)

Para a realização dos cultivos de crescimento utilizou-se o mesmo meio das tabelas 3.1 e 3.2, porém com alterações na adição de cada um dos suplementos segundo planejamento experimental 2³ apresentado posteriormente. Sendo assim, as quantidades de água e de solução da fonte de carbono foram ajustadas conforme cada ensaio programado, uma vez que, os teores de açúcar redutor do hidrolisado amiláceo e do soro de queijo foram considerados. Para os cultivos com limitação de nitrogênio e maior quantidade de suplementos o mesmo meio das tabelas 3.1 e 3.2 foi utilizado, porém com alterações nas quantidades de hidrolisado amiláceo, soro de queijo e óleo de soja, e redução na concentração da fonte de nitrogênio de 2,27 g.L⁻¹ para 1,135 g.L⁻¹ de ureia, limitando estes experimentos em nitrogênio para suposto acúmulo do biopolímero.

3.4 Condições das pré-culturas

Para propagação e cultivo do micro-organismo *Cupriavidua necator*, foram realizadas duas pré-culturas em erlenmeyers aletados de 500 mL (NB) e 1000 mL (MM). A primeira pré-cultura contendo 150 mL de meio caldo nutriente (NB) foi inoculada com

três alçadas da cepa mantida em meio nutriente ágar (NA). Esta pré-cultura foi incubada em agitador rotatório (*shaker*) a 35°C e 150 rpm por 24 h.

Após esse período, a segunda pré-cultura contendo meio mineral não limitado em volume de 400 mL, foi conduzida em erlenmeyer aletado de 1000 mL, a mesma recebeu uma quantidade correspondente a 10 % de seu volume inicial de trabalho de meio propagado proveniente da primeira pré-cultura. Da mesma forma, este meio foi incubado em *shaker* a 35°C, 150 rpm e pH 7,0 até atingir crescimento celular medido em valores de absorbância de 0,800 diluição 1:100. O pH foi mantido por meio da adição manual de soluções de NaOH 5 % ou HCl 10 %.

3.5 Condições de cultivo para crescimento (planejamento experimental) e demais experimentos

Os cultivos do planejamento experimental e demais experimentos partiram de um volume inicial de trabalho de 1000 mL (para cada ensaio), e foram realizados em frascos de vidro com volume útil de 3 L. Os mesmos foram adaptados, de forma a obter-se um sistema de vedação passível de troca de gases e com possibilidade de retirada de amostra ao longo do tempo, de modo a se fazer o acompanhamento do pH e do crescimento celular por medida de absorbância em comprimento de onda 600 nm. A figura 3.1 ilustra o esquema descrito acima.



Figura 3.1 - Frascos adaptados contendo os cultivos

A segunda pré-cultura descrita anteriormente foi utilizada para a inoculação dos meios de cultivo para crescimento no planejamento e demais experimentos, na proporção de 10 % do volume inicial de trabalho. As condições de temperatura, pH e agitação foram mantidas em 35°C, pH entre 6,0 e 7,0 e 150 rpm, respectivamente.

3.5.1 Suplemento nutricional

As culturas realizadas em meio sintético utilizaram como fonte de carbono glicose/frutose PA. Uma solução de glicose/frutose PA foi preparada e adicionada ao meio de modo a obter-se 40 g.L^{-1} de açúcares redutores. Estudos realizados por FIORESE (2008), IENCZAK (2006) e IENCZAK (2011) mostraram que o micro-organismo em estudo possui uma faixa ótima de crescimento entre $15 - 40 \text{ g.L}^{-1}$.

Hidrolisado amiláceo e soro de queijo

Em virtude do hidrolisado amiláceo e o soro de queijo apresentarem concentrações de açúcares redutores significativas, estas foram levadas em consideração na composição da fonte de carbono quando utilizadas nos experimentos de acordo com as proporções propostas pelo planejamento experimental e demais experimentos realizados, da mesma forma que no meio sintético estas proporções foram preparadas de forma a se obter 40 g.L^{-1} de açúcares redutores totais no meio a ser testado.

Cabe ressaltar que ao contrário do hidrolisado amiláceo o soro de queijo não precisou passar por um processo de quebra (hidrólise ácida), uma vez que, o seu açúcar compositor, a lactose, é um açúcar redutor, capaz de ser assimilável pelo *Cupriavidus necator*. O único processo utilizado no soro de queijo foi o ajuste de seu pH para 7,0 uma vez que, o soro de queijo possui um pH de 4,35.

Óleo de soja

O óleo de soja utilizado foi adquirido comercialmente na cidade de Toledo. Pelo fato de seu pH ser neutro, não foi necessário ajuste. Este foi autoclavado e adicionado ao meio de cultivo nas proporções propostas pelo planejamento experimental.

3.5.2 Estratégias de alimentação

Alimentações foram realizadas sempre que a concentração de açúcares redutores decresceu à aproximadamente 20 g.L^{-1} . Este valor foi monitorado durante a cultura, através do acompanhamento do consumo de açúcares redutores pelo método do DNS (item 3.1.4). A alimentação foi realizada a partir de uma solução concentrada (500 g.L^{-1}) de glicose/frutose de forma a proporcionar uma concentração final próxima à 40 g.L^{-1} de fonte de carbono no meio.

3.6 Planejamento experimental e análise estatística

Um planejamento fatorial completo 2^3 consiste em realizar experimentos e registrar as respostas observadas, através de todas as combinações possíveis com as três variáveis em dois níveis, formando uma matriz de planejamento resultando em 8 experimentos, em que X1, X2, e X3 são as variáveis escolhidas e os valores (-1) e (+1) referem-se aos níveis inferior e superior de cada, respectivamente.

Desta forma, um planejamento experimental fatorial completo 2^3 foi aplicado para avaliar na biomassa produzida (XT), por um período comum de tempo (27 h), a influência do: hidrolisado amiláceo (H), soro de queijo (S) e óleo de soja (OS), conforme mostra a tabela 3.3, em seus respectivos níveis reais e codificados (-1, 0 e +1).

Tabela 3.3 - Níveis reais e codificados das variáveis para planejamento experimental fatorial completo 2^3

Fator	Nível inferior (-1)	Nível central (0)	Nível superior (+1)
Hidrolisado amiláceo (H) (%)	0	5	10
Soro de queijo (S) (%)	0	5	10
Óleo de soja (OS) (%)	0	5	10

A matriz de planejamento com variáveis codificadas e reais é mostrada na tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Matriz de planejamento fatorial completo 2^3 com variáveis codificadas e reais

Experimento	Variáveis		
	H	S	OS
1	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)
2	+1 (10)	-1 (0)	-1 (0)
3	-1 (0)	+1 (10)	-1 (0)
4	+1 (10)	+1 (10)	-1 (0)
5	-1 (0)	-1 (0)	+1 (10)
6	+1 (10)	-1 (0)	+1 (10)
7	-1 (0)	+1 (10)	+1 (10)
8	+1 (10)	+1 (10)	+1 (10)
9	0 (5)	0 (5)	0 (5)
10	0 (5)	0 (5)	0 (5)
11	0 (5)	0 (5)	0 (5)

De posse dos resultados obtidos no planejamento é possível calcular os efeitos principais e de interação das variáveis sobre as respostas, especificando os efeitos mais significativos.

As análises estatísticas para todos os planejamentos propostos foram realizadas utilizando-se o software Statistica V. 8.0.

3.7 Demais experimentos – Cultivos limitados e com maior quantidade de suplementos

Após realizados os cultivos conforme o planejamento experimental, quatro novos cultivos denominados por A, B, C e D, foram desenvolvidos a fim de utilizá-los em substituição aos componentes sintéticos do meio. O período de cultivo destes experimentos foi de 96 h e estes foram realizados com limitação de nitrogênio (menor adição da fonte) e modificações nas concentrações de suplementos conforme apresenta a tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Descrição dos meios utilizados nos demais experimentos

	ENSAIO A	ENSAIO B	ENSAIO C	ENSAIO D
	(0 % H + 0 % S + 0 % OS) ^a	(100 % H) ^a	(50 % S) ^a	(5 % H + 5 % S + 10 % OS) ^a
Solução 1 - Nutrientes	Meio mineral total com limitação de nitrogênio	Meio mineral sem adição de água e com limitação de nitrogênio	Meio mineral total com limitação de nitrogênio e menor quantidade de água	Meio mineral total com limitação de nitrogênio
Solução 2 – Fonte de fosfato	Fosfato de potássio	Fosfato de potássio	Fosfato de Potássio	Fosfato de potássio
Solução 3 - Fonte de carbono	Glicose Frutose	Hidrolisado	Soro de queijo Glicose/Frutose	Soro de queijo Hidrolisado Glicose/Frutose

^a H: Hidrolisado; S: Soro de queijo; OS: Óleo de soja.

Conforme mostra a tabela 3.5 as quantidades de água e de solução da fonte de carbono foram ajustadas conforme cada ensaio programado, uma vez que, os teores de açúcar redutor do hidrolisado amiláceo e do soro de queijo foram considerados.

No ensaio B utilizou-se apenas o hidrolisado amiláceo como líquido, não havendo adição da solução 3 na forma de glicose/frutose, para isso, o hidrolisado foi submetido a um processo de evaporação a fim de concentrar a quantidade de açúcares presentes, de modo a obter uma concentração final no meio de cultivo de 40 g.L⁻¹ de açúcares redutores.

3.8 Técnicas Analíticas

3.8.1 Amostragem

Durante o cultivo, alíquotas de 8 mL foram retiradas dos frascos adaptados, em intervalos de 2 a 6 h para acompanhar a cinética de crescimento (absorbância), produção de biomassa total seca, proteína, consumo de substrato (S), consumo de nitrogênio (N). Nos demais cultivos de crescimento, além destas determinações também foi realizada a quantificação de P(3HB).

3.8.2 Determinações analíticas

3.8.2.1 Determinação da concentração de biomassa (XT)

Para acompanhar a evolução do crescimento microbiano, utilizaram-se três métodos, um indireto e outros dois diretos. O método indireto baseou-se no procedimento já realizado por MARANGONI (2000), SQUIO (2003), FIORESE (2004) e IENCZAK (2006) o qual consiste em fazer a leitura da amostra em espectrofotômetro a 600 nm (ANEXO 08). O primeiro método direto foi baseado em RODRIGUES (2005b) e adaptado, consistiu na determinação da massa celular seca das amostras em eppendorf (ANEXO 09). O segundo método direto foi baseado na metodologia descrita por SQUIO (2003), onde é realizada a determinação da massa celular seca das amostras em membranas (ANEXO 10).

3.8.2.2 Determinação de proteína

A determinação da dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Biureto descrito por STICKLAND (1951) (ANEXO 11).

3.8.2.3 Dosagem de açúcares

A concentração de açúcares redutores totais foi determinada pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959) descrito no item 3.1.4.

3.8.2.4 Determinação de nitrogênio

O nitrogênio determinado no meio de cultura é o nitrogênio amoniacal. A dosagem deste foi realizada utilizando-se o *kit* Ureia ES (Gold Analisa), que determina ureia pelo método enzimático-colorimétrico (ANEXO 12).

3.8.2.5 Determinação de P(3HB)

A determinação da concentração de P(3HB) foi realizada através de cromatografia gasosa, conforme o método de metanólise baseado em BRANDL *et al.* (1990), (ANEXO 13).

Cromatografia gasosa

A coluna utilizada para a determinação de P(3HB) foi de sílica fundida (50 m x 0,32 mm x 1,22 μm), marca *Varian*, modelo CP-WAX 52 CB. O cromatógrafo usado foi da marca AGILENT TECHNOLOGIES modelo 7820A GC SYSTEM, equipado com um detector FID, utilizando vazão de ar 400 mL.min⁻¹, hidrogênio 30 mL.min⁻¹ e gás de arraste nitrogênio com fluxo constante de 25 mL.min⁻¹ a uma pressão equivalente de 9,2725 psi. O volume injetado foi de 1 μL (injeção manual) e as temperaturas de injeção e detecção foram respectivamente de 220°C e 225°C. O perfil das temperaturas da coluna foram: 0 – 2 min a 50°C; 2 – 12 min até 225°C (17,5°C / min). A integração e os cromatogramas foram obtidos através do *software EZChrom Elite Compact*. Exemplos de cromatogramas da curva padrão e amostras podem ser vistos no ANEXO 13 - figuras A.5 a A.28.

3.9 Tratamento de dados

3.9.1 Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$)

Para o cálculo da velocidade específica de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$), derivou-se a equação da função polinomial de XT em função de t ajustada aos pontos experimentais obtidos, calculou-se a derivada em intervalos de tempo (ponto inicial e final da fase exponencial) e dividiu-se o valor da derivada pelo valor da concentração celular correspondente àquele tempo, segundo a equação 3.1:

$$\mu_{XT} = \frac{1}{XT} \cdot \frac{dXT}{dt} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

Com o acompanhamento cinético da concentração celular, a máxima velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), foi calculada traçando-se curvas, relacionando os logaritmos neperianos das concentrações celulares, obtidas com os dados da curva ajustada aos pontos experimentais, com os seus respectivos tempos de amostragem (equação 3.2).

$$XT_f = XT_i \cdot e^{\mu_{\text{máx}} (t_f - t_i)} \quad (\text{Eq. 3.2})$$

Em uma curva característica de crescimento celular microbiano a fase exponencial apresenta um comportamento linear, sendo o coeficiente angular desta reta, o próprio valor de $\mu_{\text{máx}}$ (conforme ilustração da figura 3.2).

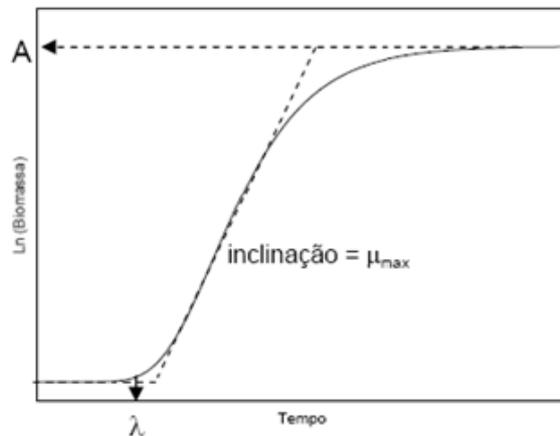


Figura 3.2 - Curva de crescimento microbiano com os parâmetros biológicos em função do tempo

Re-escrevendo a equação 3.2, tem-se:

$$\ln XT_f = \ln XT_i + \mu_{\text{máx}} \cdot (t_f - t_i) \quad (\text{Eq.3.3})$$

$$\ln \left(\frac{XT_f}{XT_i} \right) = \mu_{\text{máx}} \cdot (t_f - t_i) \quad (\text{Eq. 3.4})$$

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{\ln \left(\frac{XT_f}{XT_i} \right)}{(t_f - t_i)} \quad (\text{Eq. 3.5})$$

3.9.2 Fatores de conversão

3.9.2.1 Fator de conversão de substrato em biomassa total

O fator de conversão é obtido a partir do coeficiente angular da porção linear do gráfico da concentração de biomassa total contra a concentração de substrato, de acordo com a equação 3.6, re-escrita na equação 3.7:

$$Y_{XT/S} = -\frac{dXT}{dS} \quad (\text{Eq.3.6})$$

$$Y_{XT/S} = \frac{(XT_t - XT_{t_0})}{(S_{t_0} - S_t)} \quad (\text{Eq. 3.7})$$

Onde:

$Y_{XT/S}$ = fator de conversão de substrato em biomassa total (g.g^{-1}).

XT_t = quantidade de biomassa total final em um determinado instante t (g.L^{-1}).

XT_{t_0} = quantidade de biomassa total inicial em um determinado instante t_0 (g.L^{-1}).

S_{t_0} = quantidade de substrato inicial em um determinado instante t_0 (g.L^{-1}).

S_t = quantidade de substrato final em um determinado instante t (g.L^{-1}).

3.9.2.2 Fator de conversão de nitrogênio em biomassa total

O fator de conversão é obtido a partir do coeficiente angular da porção linear do gráfico da concentração de biomassa total contra a concentração de nitrogênio, de acordo com a equação 3.8, re-escrita na equação 3.9:

$$Y_{XT/N} = -\frac{dXT}{dN} \quad (\text{Eq.3.8})$$

$$Y_{XT/N} = \frac{(XT_t - XT_{t_0})}{(N_{t_0} - N_t)} \quad (\text{Eq. 3.9})$$

Onde:

$Y_{XT/N}$ = fator de conversão de nitrogênio em biomassa total (g.g^{-1}).

XTt_f = representa a quantidade de biomassa total final no instante t_f (g.L^{-1}).

XTt_0 = representa a quantidade de biomassa total inicial no instante t_0 (g.L^{-1}).

Nt_0 = representa a quantidade de nitrogênio inicial no instante t_0 (g.L^{-1}).

Nt_f = representa a quantidade de nitrogênio final no instante t_f (g.L^{-1}).

3.9.3 Produtividade em P(3HB)

A produtividade média foi calculada pela diferença entre a quantidade de P(3HB) em um instante de tempo t e a quantidade inicial de P(3HB), dividida pelo intervalo de tempo correspondente, conforme a equação 3.10:

$$\text{Pr}_{P(3HB)} = \frac{(P(3HB)_t - P(3HB)_{t_0})}{(t - t_0)} \quad (\text{Eq. 3.10})$$

Onde:

$\text{PrP}(3HB)$ = produtividade média de P(3HB) ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

$P(3HB)_t$ = concentração de P(3HB) no instante de tempo t (g.L^{-1}).

$P(3HB)_{t_0}$ = concentração de P(3HB) no instante de tempo t_0 inicial (g.L^{-1}).

t = tempo de cultivo num determinado instante t (h).

t_0 = tempo inicial do período considerado (h).

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização dos resíduos

A produção de P(3HB) por micro-organismos depende das condições de cultivo, dos substratos e suplementos fornecidos. A caracterização dos meios de cultivo é de fundamental importância, pois grande parte dos micro-organismos, dentre eles, *Cupriavidus necator*, necessitam de limitação de algum nutriente essencial assim como, excesso de carbono no meio em que se desenvolvem, para que então, haja regulação de seu metabolismo e inicie-se o processo de absorção de carbono e acúmulo do mesmo em forma de grânulos como reserva de energia (LEE, 1996a; LUENGO *et al.*, 2003 citados por KRUEGER, 2009). Tal fato levou à realização de cultivos buscando estudar as condições de crescimento do micro-organismo *C. necator* em meio sintético (glicose/frutose) e suplementados com substratos de baixo custo. Na tabela 4.1 encontra-se apresentada a caracterização dos resíduos em estudo.

Tabela 4.1 - Caracterização dos resíduos utilizados como suplementos

ANÁLISE	Bagaço de mandioca hidrolisado	Soro de queijo
pH	-	4,35
Alcalinidade	37,5 mg CaCO ₃	475,0 mg CaCO ₃
Acidez	1550,0 mg CH ₃ COOH	2710,0 mg CH ₃ COOH
Sólidos totais	0,74 % ou 7423 mg.L ⁻¹	6,71 % ou 68280 mg.L ⁻¹
Sólidos voláteis	0,67 % ou 6710 mg.L ⁻¹	6,32 % ou 64265 mg.L ⁻¹
Açúcar redutor	2,1 % ou 21,176 g.L ⁻¹	3,9 % ou 39,534 g.L ⁻¹
DQO	7448,00 mg.L ⁻¹ de O ₂	82080,00 mg.L ⁻¹ de O ₂
DBO	11320 mg.L ⁻¹	58734 mg.L ⁻¹
Nitrogênio total	302,57 mg.L ⁻¹	935,20 mg.L ⁻¹
Fosfato total	26,86 mg.L ⁻¹	250,07 mg.L ⁻¹

De acordo com CARDOSO (2005), os valores de DQO do resíduo da mandioca encontrados na literatura ficam em torno de 6280 mg.L⁻¹, em seus estudos o autor obteve 7747 mg.L⁻¹, valor este próximo ao encontrado neste estudo, que foi de 7448 mg.L⁻¹. O valor médio da DBO do resíduo da mandioca varia de 14000 a 34000 mg.L⁻¹ segundo LAMO & MENEZES (1979). FEIDEN & CEREDA (2003) obtiveram em seu estudo o valor de 11484 mg.L⁻¹, valor este próximo ao obtido para o hidrolisado amiláceo (11320 mg.L⁻¹).

O soro de queijo é caracterizado principalmente pela elevada carga orgânica DQO de 50000-80000 mg.L⁻¹ e DBO de 30000-60000 mg.L⁻¹, dependendo do processamento

específico utilizado na fabricação de queijos (BRANDÃO, 1994), e a imensa quantidade de efluentes gerados (cerca de 3,7 bilhões de litros só no ano de 2002) (ALMEIDA & DURAN, 2003). O soro de queijo utilizado neste estudo apresentou valores próximos as faixas relatadas na literatura sendo a DQO 82080 mg.L⁻¹ de O₂ e a DBO 58734 mg.L⁻¹.

Devido ao elevado teor de matéria orgânica constatado nos resíduos em estudo após a caracterização, é possível dizer que estes, tornam-se aplicáveis à produção biotecnológica de compostos de maior valor agregado, como é o caso do P(3HB).

A quantidade de sólidos totais presente no hidrolisado amiláceo (7423,33 mg.L⁻¹) foi próxima à 5800 mg.L⁻¹ citada nos estudos de CARDOSO (2005). O mesmo autor em seu trabalho, encontrou valores mais elevados 6024 mg.L⁻¹ sendo este próximo ao deste estudo.

O teor de sólidos totais presentes no soro de queijo foi bem maior se comparado com a presença de sólidos totais no hidrolisado amiláceo, representou 6,71 % (68280 mg.L⁻¹) do total. Segundo MORESI (1994) o resíduo resultante da fabricação de queijos, obtido numa proporção média de 9:1: v/v da quantidade de queijo fabricada, contém cerca de 6,0 - 6,5 % de sólidos totais e 4,0 - 5,0 % de lactose.

A análise da quantificação de açúcares redutores mostrou que tanto o hidrolisado amiláceo quanto o soro de queijo, apresentaram teores de açúcar consideráveis, 2 % (21,176 g.L⁻¹) e aproximadamente 4 % (39,534 g.L⁻¹), respectivamente, com valores semelhantes aos da literatura citados por CEREDA (1996) 20 a 40 g.L⁻¹ para o hidrolisado amiláceo e 3,78 % (FONSECA, 2008) e 4,27 % (FORNARI, 2006) para o soro de queijo, caracterizando-os como interessantes fontes de carbono para o crescimento do micro-organismo.

Da mesma forma que o carbono dos resíduos é relevante para o crescimento microbiano, o nitrogênio presente também auxilia no metabolismo para formação de proteínas e síntese celular. Através da caracterização, foi possível detectar a presença de concentrações de nitrogênio total (N) tanto no hidrolisado amiláceo quanto no soro de queijo sendo 302,57 mg.L⁻¹ e 935,20 mg.L⁻¹, respectivamente, indicando assim que, os resíduos em estudo podem também ser utilizados como nutriente pelo micro-organismo para seu crescimento celular.

4.2 Comportamento de *C. necator* em diferentes composições de cultivos

O processo de produção de P(3HB) por *Cupriavidus necator* é conduzido em duas fases distintas: **fase de crescimento** não limitado com produção de biomassa e **fase de produção** com acúmulo de polímero (DAWES & SENIOR, 1973). Segundo FIORESE (2008), se a primeira fase tiver uma produtividade elevada de células haverá uma melhoria na produtividade global do polímero. Portanto, é interessante utilizar condições de cultivo que proporcionem valores de velocidade de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) altos.

Para a avaliação de qual suplemento: hidrolisado amiláceo (H), soro de queijo (S) e óleo de soja (OS), ou combinação destes foi mais favorável ao crescimento de *C. necator*, pode-se observar as evoluções da concentração de biomassa total e proteína, e os consumos da concentração de substrato e nitrogênio ao longo dos onze cultivos que foram iniciados com aproximadamente 40 g.L⁻¹ de fonte de carbono em volume de 1 L e se encontram apresentados nas figuras 4.1 a 4.11, respectivamente. As culturas foram realizadas por um período definido de 27 h.

Através das figuras 4.1 a 4.11 é possível verificar que nos onze ensaios realizados em diferentes meios de cultivo para o crescimento de *C. necator* uma curva característica de crescimento celular microbiano foi observada, na qual a biomassa total aumentou exponencialmente. Observou-se também um aumento do conteúdo protéico ao longo do tempo de experimento, sendo que o mesmo seguiu o comportamento da curva de biomassa total. As concentrações de substrato e nitrogênio foram diminuindo ao longo do tempo devido ao consumo destes nutrientes para a síntese celular. Cabe ressaltar que a curva de consumo de nitrogênio contém valores de concentração expressos de forma qualitativa, e não quantitativa, isto se dá, devido a análise ser realizada por *kit* enzimático-colorimétrico, sendo utilizada apenas como um indicativo de consumo e não de exatidão, como já observado por DALCANTON (2006), FIORESE (2008), IENCZAK (2011).

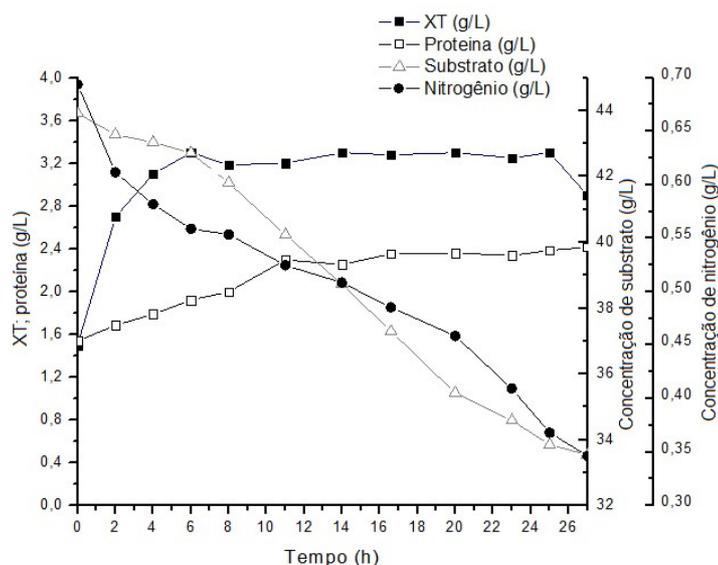


Figura 4.1 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em g.L^{-1} , em função do tempo para o ensaio 01 (padrão: 0 % H, 0 % S, 0 % OS) do planejamento

A figura 4.1 mostra que a evolução de *Cupriavidus necator* em meio sintético (ensaio 01) apresentou-se similar ao comportamento padrão de crescimento microbiano para este micro-organismo. A duração da fase de crescimento exponencial ocorreu até 6 h e a biomassa total obtida durante esta fase foi de $3,3 \text{ g.L}^{-1}$, resultados estes semelhantes aos obtidos por FIORESE (2008) que em 7,5 h obteve $2,3 \text{ g.L}^{-1}$. A velocidade específica máxima de crescimento foi de $0,18 \text{ h}^{-1}$, valor este bem próximo aos já observados por OLIVEIRA (1999); MARANGONI *et al.* (2002); KIM *et al.* (1994) e SCHNEIDER (2006) que obtiveram valores de $\mu_{\text{máx}}$ entre $0,19$ e $0,23 \text{ h}^{-1}$.

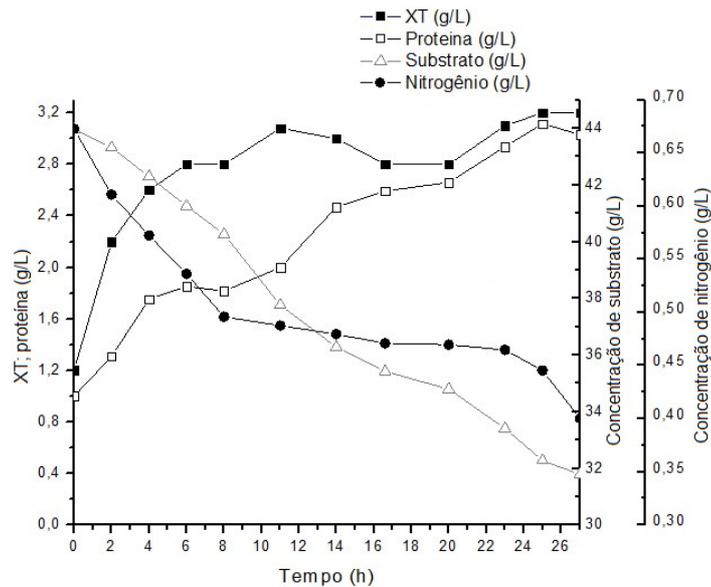


Figura 4.2 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em g.L^{-1} , em função do tempo para o ensaio 02 (10 % H) do planejamento

DALCANTON (2006) em seus experimentos utilizando *C. necator*, comparando cultivos contendo glicose e outro contendo hidrolisado amiláceo como fonte de carbono, percebeu que a bactéria apresentou o mesmo comportamento nos dois substratos. Da mesma forma que observado pelo autor acima citado, o ensaio 02 realizado neste estudo também apresentou este comportamento (figura 4.2). O *C. necator* não apresentou fase lag, ou seja, adaptou-se bem ao meio com suplemento amiláceo, obtendo velocidade específica máxima de crescimento de $0,19 \text{ h}^{-1}$ e uma biomassa ao final de 6 h de $2,8 \text{ g.L}^{-1}$.

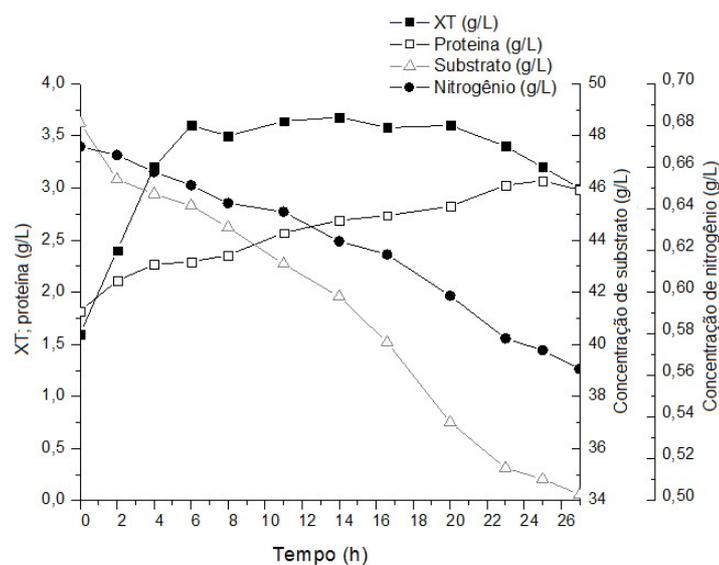


Figura 4.3 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em g.L^{-1} , em função do tempo para o ensaio 03 (10 % S) do planejamento

Através da figura 4.3 (ensaio 03), é possível perceber que o uso do suplemento soro de queijo não provocou o surgimento de fase lag, indicando assim, como no ensaio 02 (figura 4.2) que este suplemento é de fácil assimilação pelo micro-organismo em estudo, apresentando uma velocidade específica de crescimento do *C. necator* de $0,17 \text{ h}^{-1}$ e uma biomassa ao final de 6 h de $3,6 \text{ g.L}^{-1}$.

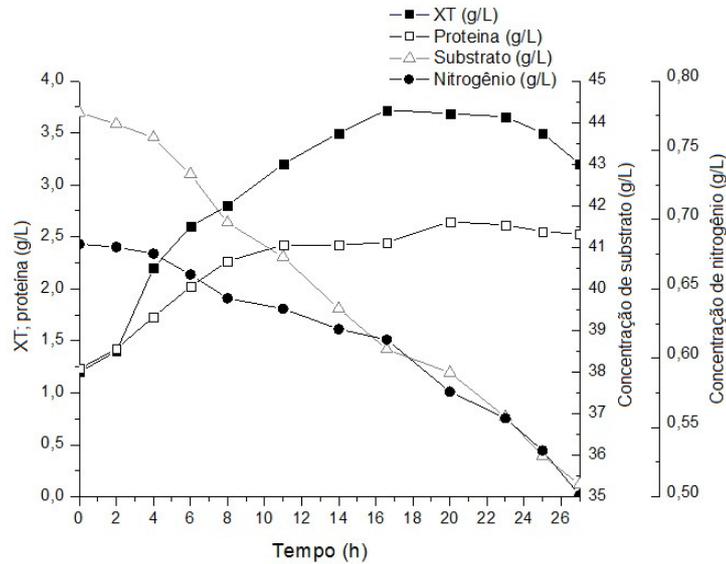


Figura 4.4 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio expressos em g.L^{-1} , em função do tempo para o ensaio 04 (10 % H + 10 % S) do planejamento

Observando a figura 4.4 é possível perceber que no cultivo contendo hidrolisado amiláceo e soro de queijo (ensaio 04), o micro-organismo apresentou duas horas de fase pré-exponencial, de aceleração. Isto pode ser decorrente da interação dos suplementos no meio. Neste ensaio obteve-se uma velocidade específica de crescimento de $0,22 \text{ h}^{-1}$, com uma produção de biomassa de $2,6 \text{ g.L}^{-1}$ durante 6 h de duração da fase.

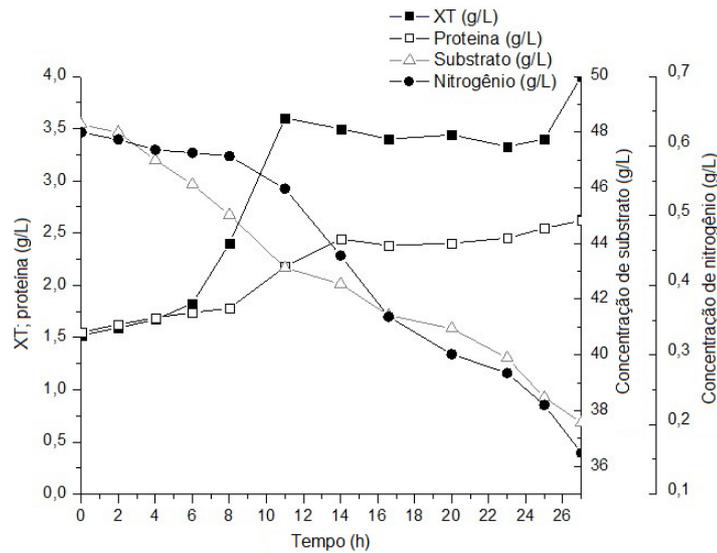


Figura 4.5 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio expressos em g.L⁻¹, em função do tempo para o ensaio 05 (10 % OS) do planejamento

Avaliando-se a figura 4.5 (ensaio 05), observa-se que a adição de óleo de soja como suplemento ao meio de cultivo provocou uma fase de 6 h de adaptação do micro-organismo, isso pode ser devido ao fato do óleo não ficar solúvel no meio, o que pode ter dificultado a assimilação deste suplemento pelo micro-organismo. Após esta fase de adaptação ocorreu um significativo crescimento exponencial com velocidade específica de crescimento celular de 0,21 h⁻¹, e biomassa de 3,6 g.L⁻¹ durante 11 h de fase de crescimento.

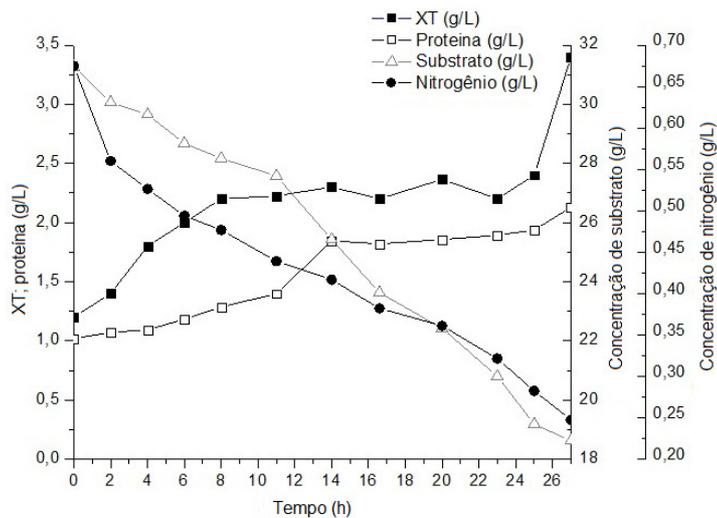


Figura 4.6 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em g.L⁻¹, em função do tempo para o ensaio 06 (10 % H + 10 % OS) do planejamento

O crescimento de *C. necator* em meio suplementado com hidrolisado amiláceo e óleo de soja (ensaio 06) não apresentou fase de adaptação do micro-organismo como observado no ensaio 05 (apenas com suplementação de óleo de soja, figura 4.5), percebe-se, no entanto, que apenas o tempo final de duração da fase exponencial foi semelhante (8 h), com uma produção de biomassa de 2,2 g.L⁻¹.

Se comparado ao meio com suplementação apenas de hidrolisado amiláceo (sem suplementação de óleo - ensaio 02 que durou 6 h, figura 4.2), observa-se que neste caso, a fase exponencial obtida durou cerca de duas horas a mais (8 h).

Tendo em vista tais ocorrências, acredita-se que a interação dos suplementos de certa forma provoca a geração o aumento da duração da fase exponencial. Além disso, neste ensaio 06 o micro-organismo apresentou também uma velocidade específica de crescimento menor (0,14 h⁻¹) se comparada ao padrão (0,19 - 0,23 h⁻¹), provavelmente devido aos diferentes nutrientes dos suplementos contidos no meio, e assimilação dos mesmos pelo micro-organismo, possuindo rotas metabólicas diferentes como a da glicólise e dos ácidos graxos.

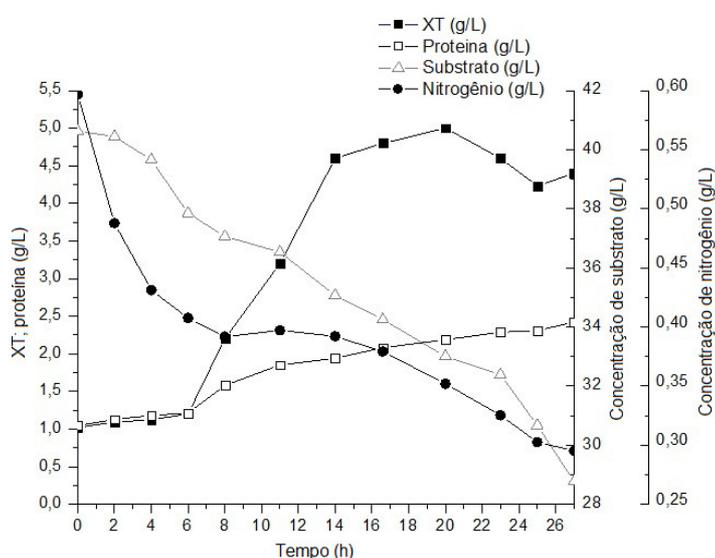


Figura 4.7 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em g.L⁻¹, em função do tempo para o ensaio 07 (10 % S + 10 % OS) do planejamento

Durante a fase de crescimento bacteriano, se deseja que a população bacteriana alcance seu máximo crescimento, degradando a matéria orgânica contida no meio com maior eficiência e consiga alcançar a fase estacionária (onde os produtos desejáveis serão formados). A duração de cada fase depende dos substratos presentes que irão influenciar na

adaptação do micro-organismo e na velocidade das reações metabólicas resultando em um lento ou rápido metabolismo.

A falta de interação dos suplementos soro de queijo e óleo de soja no ensaio 07 (figura 4.7) provocou uma fase adaptação de *C. necator* de aproximadamente 6 horas, além de uma diminuição na velocidade específica de crescimento ($0,16 \text{ h}^{-1}$), se comparada à velocidade padrão deste micro-organismo em meio sintético (ensaio 01, figura 4.1) ($0,18 \text{ h}^{-1}$), ou as obtidas para os mesmos suplementos de forma isolada nos meios, ensaio 03 (figura 4.3) e ensaio 05 (figura 4.5), $0,17 \text{ h}^{-1}$ e $0,21 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Acredita-se que a geração da fase de adaptação e diminuição da velocidade específica de crescimento, se deve ao fato dos dois suplementos terem caráter oleoso, uma vez que o soro de leite utilizado neste estudo não é desnatado.

A biomassa obtida ao final de 14 h de fase de crescimento foi de $4,6 \text{ g.L}^{-1}$.

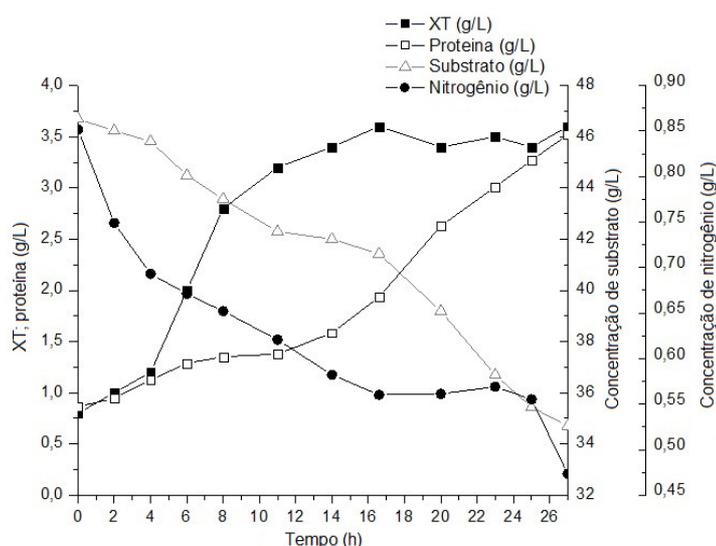


Figura 4.8 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em g.L^{-1} , em função do tempo para o ensaio 08 (10 % H + 10 % S + 10 % OS) do planejamento

Ao observar a figura 4.8, acredita-se que a mesma justificativa apresentada para o cultivo anterior (ensaio 07, figura 4.7) também possa ser aplicada a este experimento (ensaio 08), onde se observa a existência de uma fase pré-exponencial do micro-organismo ao meio com duração de 4 h. Entretanto, ao contrário dos valores das velocidades específicas de crescimento celular obtidos nos ensaios 06 e 07 ($0,14 \text{ h}^{-1}$ e $0,16 \text{ h}^{-1}$), neste o micro-organismo apresentou uma velocidade específica mais elevada $0,21 \text{ h}^{-1}$, correspondendo entretanto a valores próximos ao encontrado por OLIVEIRA (1999);

MARANGONI *et al.* (2002); KIM *et al.* (1994) e SCHNEIDER (2006). A biomassa total produzida ao final de 11 h de fase de crescimento foi de 3,2 g.L⁻¹.

As figuras 4.9, 4.10 e 4.11 apresentam a triplicata do ponto central.

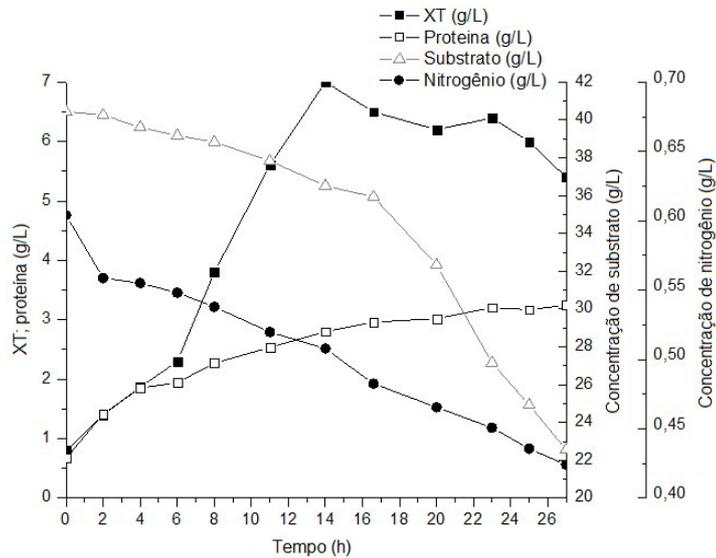


Figura 4.9 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em g.L⁻¹, em função do tempo para o ensaio 09 (triplicata do ponto central: 5 % H + 5 % S + 5 % OS) do planejamento

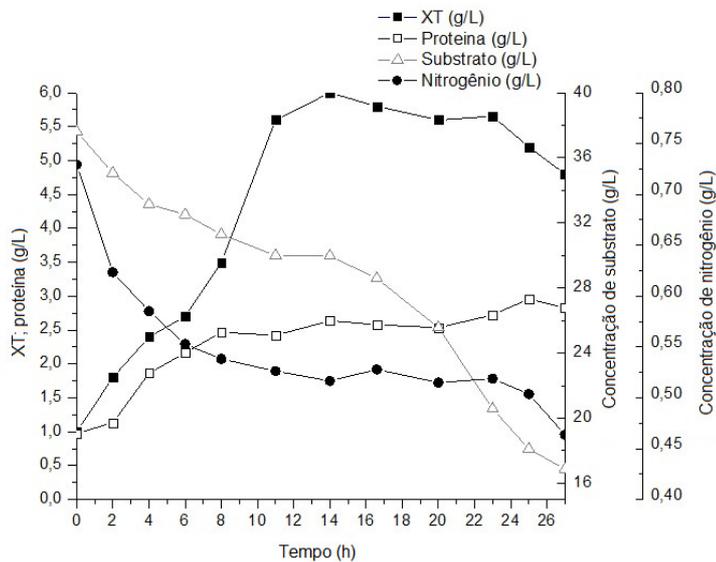


Figura 4.10 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em g.L⁻¹, em função do tempo para o ensaio 10 (triplicata do ponto central: 5 % H + 5 % S + 5 % OS) do planejamento

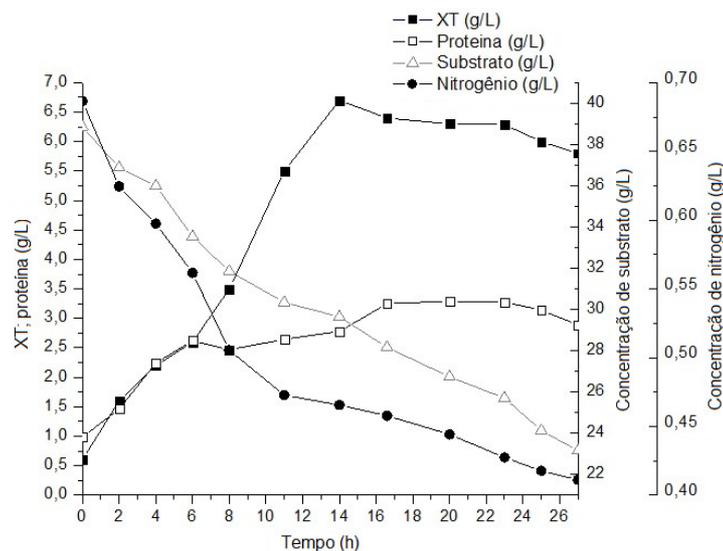


Figura 4.11 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em g.L^{-1} , em função do tempo para o ensaio 11 (triplicata do ponto central: 5 % H + 5 % S + 5 % OS) do planejamento

Ao verificar os ensaios 09, 10 e 11 (representados pelas figuras 4.9, 4.10 e 4.11), compostos pelos três fatores em seus níveis centrais, observa-se que todos apresentaram grande semelhança com relação à disposição das curvas, demonstrando assim, a eficiência do experimento. Observa-se que mesmo havendo suplementação com os 3 diferentes suplementos testados, não houve fase de adaptação por parte micro-organismo em estudo. Isto pode ser explicado devido à quantidade utilizada de cada suplemento ser mais baixa que no ensaio 08 (figura 4.8), não causando interferências significativas, com relação à disponibilidade de nutrientes no meio. Observa-se, porém uma velocidade específica de crescimento inferior às encontradas por OLIVEIRA (1999); MARANGONI *et al.* (2002); KIM *et al.* (1994) e SCHNEIDER (2006) ($0,19 - 0,23 \text{ h}^{-1}$), sendo os valores obtidos neste experimento em torno de $0,13 - 0,14 \text{ h}^{-1}$. Acredita-se que assim como explicado anteriormente, este fenômeno ocorre devido à diversidade dos substratos (suplementos) contidos no meio. Entretanto verifica-se que a quantidade de biomassa nestes ensaios 09, 10 e 11 foi de $7,0 \text{ g.L}^{-1}$, $5,6 \text{ g.L}^{-1}$ e $6,7 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente, sendo estes os ensaios que apresentaram maiores valores de biomassa.

4.3 Análise e comparação do comportamento de *C. necator* nos diferentes meios de cultivo

Os resultados da fase de crescimento obtidos para o planejamento experimental desenvolvido, com relação à duração das fases (lag (adaptação), pré-exponencial e log (exponencial)) e velocidade específica de crescimento encontram-se resumidos na tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Resumo da fase de crescimento (fase lag, pré-exponencial, log e total de crescimento (lag+pré exp+log)) dos 11 ensaios do planejamento experimental

Ensaio	Composição (H, S, OS) (%)	Duração fase lag (h)	Duração fase pré-exponencial (h)	Duração fase log (h)	Tempo total de crescimento (h)	μ (h ⁻¹)
01	0, 0, 0	0	0	6	6	0,18
02	10, 0, 0	0	0	6	6	0,19
03	0, 10, 0	0	0	6	6	0,17
04	10, 10, 0	0	2	4	6	0,22
05	0, 0, 10	6	0	5	11	0,21
06	10, 0, 10	0	0	8	8	0,14
07	0, 10, 10	6	0	8	14	0,16
08	10, 10, 10	0	4	7	11	0,21
09	5, 5, 5	0	0	14	14	0,14
10	5, 5, 5	0	0	11	11	0,14
11	5, 5, 5	0	0	14	14	0,13

Os resultados apresentados na tabela 4.2 mostram que *Cupriavidus necator* pode crescer nos diferentes meios suplementados testados neste estudo, acredita-se porém, que devido ao fato dos cultivos terem composições diferentes e por consequência o micro-organismo assimilar mais rapidamente ou lentamente os substratos que os compõem, alguns ensaios apresentaram fase de crescimento diferentes (lag, pré-exponencial e log) e consequentemente diferentes velocidades específicas máximas de crescimento.

Pode-se perceber que com exceção dos ensaios 06, 09, 10 e 11 os demais ensaios apresentaram velocidades de crescimento coerentes com os valores encontrados por OLIVEIRA (1999); MARANGONI *et al.* (2002); KIM *et al.* (1994) e SCHNEIDER (2006), se não estão dentro, encontram-se próximas da faixa 0,19 - 0,23 h⁻¹. Os ensaios que não se enquadraram dentro da referência, continham óleo em sua composição. Devido a este ter densidade diferente e também ser insolúvel no meio e na água de lavagem das células para determinação de biomassa seca, o mesmo pode não ter sido totalmente removido durante esta determinação analítica, ocasionando erro na sua quantificação; outra justificativa por fim, como também citado por FINKLER (2002), cabe lembrar que o

presente trabalho foi realizado em frascos não aletados, o que pode ter causado a diminuição da velocidade específica de crescimento do micro-organismo, uma vez que o óleo cria uma barreira, dificultando ainda mais a troca de gases dentro do frasco.

Os resultados obtidos através do planejamento experimental de biomassa total (XT) durante a fase de crescimento dos 11 ensaios (tabela 4.3) foram analisados de forma estatística e estão apresentados a seguir.

Tabela 4.3 - Matriz de dados da fase de crescimento

Ensaio	Hidrolisado	Soro	Óleo	Biomassa total – XT (g.L ⁻¹)
01	-1	-1	-1	3,3
02	1	-1	-1	2,8
03	-1	1	-1	3,6
04	1	1	-1	2,6
05	-1	-1	1	3,6
06	1	-1	1	2,2
07	-1	1	1	4,6
08	1	1	1	3,2
09	0	0	0	7,0
10	0	0	0	5,6
11	0	0	0	6,7

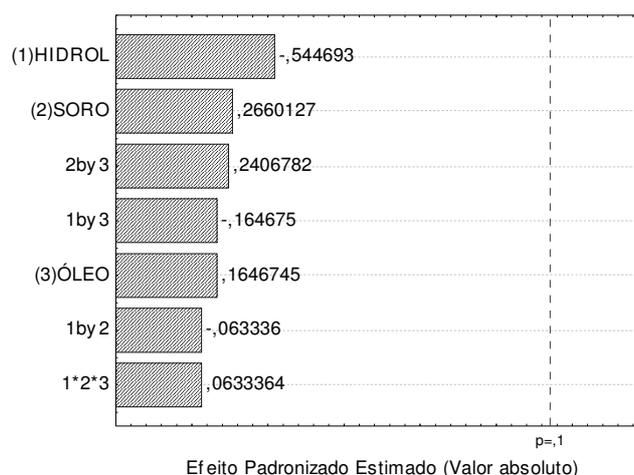
FONSECA (2003), em sua pesquisa utilizando de *E. coli* recombinante proveniente de inserção de plasmídeos de *C. necator*, em meio suplementado com amido hidrolisado, soro de queijo e óleo de soja em seus níveis máximos (5 %, 5 % e 5 %), obteve 4,63 g.L⁻¹ como valor de biomassa, no presente estudo, percebeu-se que nas mesmas proporções dos mesmos três suplementos (5 %, 5 % e 5 %) utilizados nos cultivos (ensaios 09, 10 e 11), as maiores quantidades de biomassa produzidas (7,0 g.L⁻¹, 5,6 g.L⁻¹ e 6,7 g.L⁻¹, respectivamente) também foram conseguidas e de acordo com MARANGONI *et al.* (2000) e KAHAR *et al.* (2004), a utilização de suplementos pode interferir na via metabólica proporcionando maior produção de células e resultando em maior produtividade.

A tabela 4.4 mostra os efeitos obtidos através da análise estatística para cada uma das respostas observadas quanto à biomassa total produzida durante a fase de crescimento, enquanto que a figura 4.12 ilustra esta análise através do Gráfico de Pareto.

Tabela 4.4 - Efeitos e coeficientes ($\alpha = 0,10$)

	Efeito	Erro padrão do efeito	t(3)	P	Coef.	Erro padrão do coef.
<i>Média/Interc.</i>	4,10909	0,841542	4,882814	0,016424	4,109091	0,841542
(1)HIDROL	-1,07500	1,973590	-0,544693	0,623845	-0,537500	0,986795
(2)SORO	0,52500	1,973590	0,266013	0,807464	0,262500	0,986795
(3)ÓLEO	0,32500	1,973590	0,164675	0,879670	0,162500	0,986795
1 by 2	-0,12500	1,973590	-0,063336	0,953483	-0,062500	0,986795
1 by 3	-0,32500	1,973590	-0,164675	0,879670	-0,162500	0,986795
2 by 3	0,47500	1,973590	0,240678	0,825315	0,237500	0,986795
1*2*3	0,12500	1,973590	0,063336	0,953483	0,062500	0,986795

$R^2 = 0,139$

**Figura 4.12** - Gráfico de Pareto mostrando os efeitos sobre as fases de crescimento

Na faixa estudada, nos extremos -1 e +1, não há resultados significativos, indicando que nestes dois níveis, todas as três variáveis (fatores – hidrolisado, soro de queijo e óleo de soja) não influenciam a resposta. No entanto, a presença do ponto central permite o cálculo da curvatura.

A tabela 4.5 mostra os efeitos obtidos através da análise estatística incluindo a curvatura, enquanto que a figura 4.13 ilustra esta análise através do Gráfico de Pareto.

Tabela 4.5 - Efeitos e coeficientes ($\alpha = 0,10$)

	Efeito	Erro padrão do efeito	t(3)	p	Coef.	Erro padrão do coef.
<i>Média/Interc.</i>	3,23750	0,260608	12,42286	0,006417	3,237500	0,260608
<i>Curvatura</i>	6,39167	0,998054	6,40413	0,023526	3,195833	0,499027
(1)HIDROL	-1,07500	0,521217	-2,06248	0,175260	-0,537500	0,260608
(2)SORO	0,52500	0,521217	1,00726	0,419866	0,262500	0,260608
(3)ÓLEO	0,32500	0,521217	0,62354	0,596564	0,162500	0,260608
1 by 2	-0,12500	0,521217	-0,23982	0,832806	-0,062500	0,260608
1 by 3	-0,32500	0,521217	-0,62354	0,596564	-0,162500	0,260608
2 by 3	0,47500	0,521217	0,91133	0,458321	0,237500	0,260608
1*2*3	0,12500	0,521217	0,23982	0,832806	0,062500	0,260608

$R^2 = 0,96$

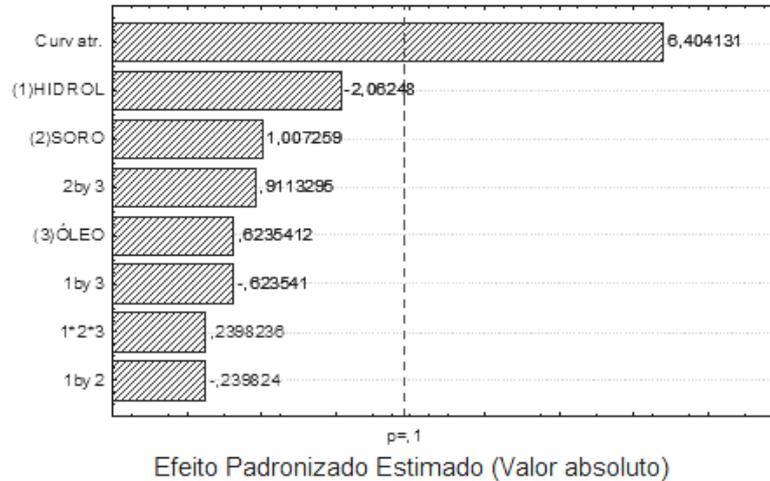


Figura 4.13 - Gráfico de Pareto mostrando os efeitos sobre as fases de crescimento, incluindo a curvatura

O tipo de planejamento usado, com níveis -1 e +1, geram modelos lineares. A triplicata no ponto central (inserção de um terceiro nível) permite calcular a curvatura, ou seja, quando o modelo linear não ajusta os pontos experimentais a curvatura se mostra significativa (com baixo p-valor), indicando que um modelo não linear (quadrático) ajustaria melhor os pontos experimentais.

4.4 Acompanhamento do comportamento de *C. necator* em cultivos limitados em nitrogênio e com maior quantidade de suplementos

Quatro ensaios determinados conforme a tabela 3.5 foram realizados durante um período de 96 h para avaliar o comportamento de *C. necator* em cultivos limitados em nitrogênio e com maior quantidade de suplementos. A escolha do elemento nitrogênio como limitante se deve ao fato de o crescimento da biomassa ser mais dependente deste elemento, já que 95 % do nitrogênio metabolizado é utilizado na síntese de proteínas (REPASKE & REPASKE, 1976). Como as proteínas representam cerca de 60 % da biomassa residual (total menos a quantidade de P(3HB)), o nitrogênio é facilmente consumido, o que facilita o controle do crescimento limitado.

Todos os ensaios foram iniciados com aproximadamente 40 g.L⁻¹ de fonte de carbono (glicose/frutose (ensaio A), hidrolisado amiláceo (ensaio B), 50% soro de queijo + 50% glicose/frutose (ensaio C), 5% hidrolisado amiláceo + 5% soro de queijo + 90% glicose/frutose (ensaio D)), quando a concentração de fonte de carbono no meio tornou-se limitante (por volta de 20 – 15 g.L⁻¹), os ensaios foram alimentados a partir de uma solução

500 g.L⁻¹ (glicose/frutose) de forma a recuperar uma concentração ideal da fonte de carbono no meio (próximo de 50 – 40 g.L⁻¹).

A linha vertical delimita o fim da fase de crescimento exponencial e início da fase estacionária, demonstra também o momento da limitação da fonte de nitrogênio e início da suposta fase de produção de P(3HB).

Como discutido por RAMSAY *et al.* (1990), concentrações abaixo de 0,20 g.L⁻¹ de nitrogênio já permitem o acúmulo de P(3HB). Cabe ressaltar, como já citado anteriormente, que a curva de consumo de nitrogênio contém valores de concentração expressos apenas de forma qualitativa, e não quantitativa, de acordo com DALCANTON (2006), FIORESE (2008) e IENCZAK (2011).

Para melhor visualização e avaliação de qual suplemento ou combinação destes foi mais favorável ao crescimento de *C. necator*, as evoluções da concentração de biomassa total e proteína, e os consumos da concentração de substrato e nitrogênio, ao longo dos quatro cultivos encontram-se apresentados nas figuras 4.14 a 4.17, respectivamente.

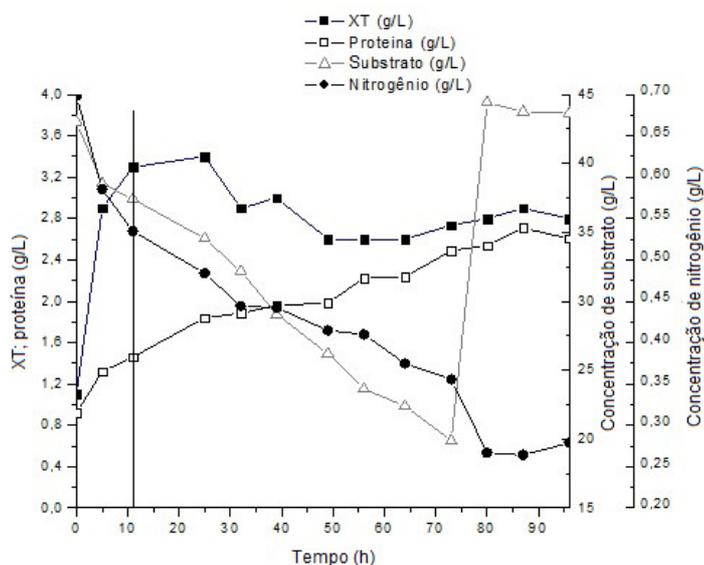


Figura 4.14 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em g.L⁻¹, em função do tempo para o ensaio A (padrão: 0 % H, 0 % S, 0 % OS)

Da mesma forma já analisada anteriormente no ensaio 01 do planejamento experimental (figura 4.1), a figura 4.14 mostra a evolução de *Cupriavidus necator* em meio sintético (meio padrão) (ensaio A). A duração da fase de crescimento de 11 h e a biomassa total obtida durante esta fase foi de 3,4 g.L⁻¹, resultado este, bastante semelhante ao obtido no cultivo de mesma composição do planejamento (ensaio 01). A velocidade específica de

crescimento de $0,19 \text{ h}^{-1}$ é correspondente à citada por OLIVEIRA (1999); MARANGONI *et al.* (2002); KIM *et al.* (1994) e SCHNEIDER (2006).

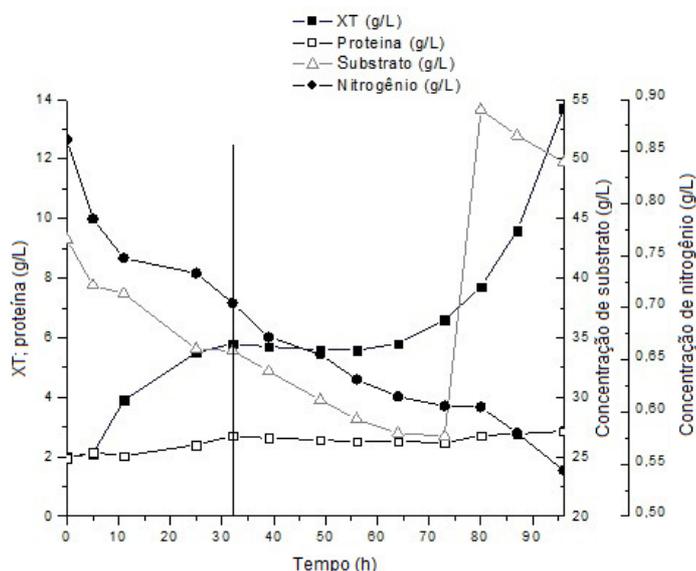


Figura 4.15 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em g.L^{-1} , em função do tempo para o ensaio B (100 % H)

Ao observar a figura 4.15 (ensaio B), é possível perceber que utilizando o hidrolisado amiláceo como única fonte de carbono no meio, ocorreu o surgimento de uma fase lag (5 h). Este período de adaptação do micro-organismo no meio contendo maior quantidade deste suplemento supostamente ocorreu devido ao fato do mesmo ser composto por outras fontes de carbono além da glicose, bem como apresentar outros nutrientes que foram se tornando disponíveis ao metabolismo do micro-organismo, devido às interações metabólicas existentes durante um processo fermentativo, promovendo a partir de então, o crescimento celular. Percebe-se, entretanto, que o hidrolisado amiláceo foi de fácil assimilação pelo micro-organismo em estudo, uma vez que durante o crescimento exponencial, este apresentou uma velocidade específica de crescimento de $0,16 \text{ h}^{-1}$ e uma produção de biomassa de $5,8 \text{ g.L}^{-1}$ em 32 h.

Observando-se a figura 4.15, pode-se verificar também, que próximo de 70 h de cultivo, após um período constante de fase de produção, ocorre novamente um crescimento exponencial da biomassa, com uma velocidade específica de crescimento de $0,24 \text{ h}^{-1}$, este fato se deve à adição da solução alimentadora de glicose/frutose já que o meio encontrava-se com concentração da fonte de carbono em estado crítico. Como a glicose/frutose são fontes de carbono de fácil assimilação por este micro-organismo, este passou a utilizá-la como fonte de carbono principal o que gerou o aumento na velocidade específica.

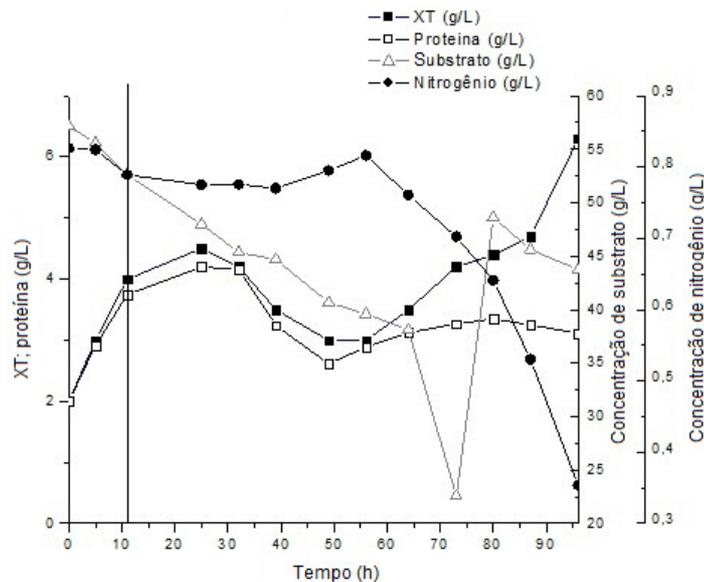


Figura 4.16 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em g.L⁻¹, em função do tempo para o ensaio C (50 % S)

A figura 4.16 representa o ensaio composto por 50 % de soro de queijo (ensaio C). É possível observar que não houve fase de adaptação do micro-organismo ao meio, característica esta já apresentada no ensaio 03 (figura 4.3) o qual continha 10 % deste suplemento. Ressalta-se ainda que este meio possibilita um crescimento específico com velocidade de 0,18 h⁻¹ semelhante aos padrões citados por OLIVEIRA (1999); MARANGONI *et al.* (2002); KIM *et al.* (1994) e SCHNEIDER (2006) (0,19 - 0,23 h⁻¹). A biomassa produzida ao final de 11 h de fase de crescimento foi de 4,0 g.L⁻¹, muito próxima à encontrada no ensaio A, após este período o micro-organismo desacelera e posteriormente entra em declínio.

Pela semelhança obtida nos ensaios A e C até 11 h de experimento acredita-se que, a partir deste momento a fonte de carbono glicose/frutose contida no ensaio C tenha se esgotado e o micro-organismo tenha sofrido uma fase de adaptação à nova fonte de carbono existente no meio, a lactose, provocando assim, um comportamento de desaceleração até 55 h de experimento, ou seja, uma fase lag. Após o tempo de 55 h, surge uma nova fase exponencial com uma velocidade específica menor de crescimento 0,12 h⁻¹ o que nos leva a acreditar que micro-organismo tenha passado a assimilar a fonte de carbono lactose (glicose + galactose) em seu metabolismo e tenha novamente promovido o seu crescimento e possivelmente produção de P(3HB).

O crescimento de *Cupriavidus necator* em lactose hidrolisada e em soro de leite foi também investigado por MARANGONI *et al.* (2002). A bactéria mostrou-se capaz de se

desenvolver muito bem em ambos substratos, sendo que, em lactose hidrolisada, observaram-se duas fases distintas de crescimento, a primeira correspondente ao consumo de glicose e a segunda, ao consumo da galactose, com velocidades específicas máximas de crescimento de $0,20$ e $0,11 \text{ h}^{-1}$, respectivamente, uma vez que a molécula de lactose (açúcar do soro de queijo) é composta por uma molécula de glicose e outra de galactose. 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 *C. necator* crescendo em outros substratos, como glicose e frutose.

Da mesma forma como observado no ensaio B (figura 4.15), ocorreu um aumento bastante significativo da biomassa (XT) após a adição da solução alimentadora de glicose/frutose ($\cong 70 \text{ h}$ de cultivo) também neste ensaio C (figura 4.16), promovendo um aumento na velocidade específica de crescimento.

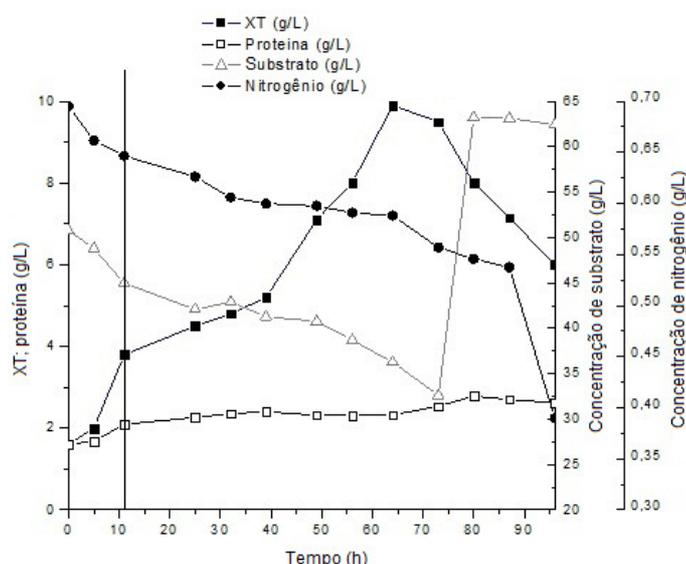


Figura 4.17 - Evoluções da biomassa total (XT) e proteína, e concentrações de substrato e nitrogênio, expressos em g.L^{-1} , em função do tempo para o ensaio D (5 % H, 5 % S, 10 % OS)

Observa-se na figura 4.17, correspondente ao ensaio D, que a biomassa obtida foi de $3,8 \text{ g.L}^{-1}$ em 11 h de fase de crescimento, com uma velocidade específica de crescimento celular de $0,20 \text{ h}^{-1}$, correspondente ao encontrado por OLIVEIRA (1999); MARANGONI *et al.* (2002); KIM *et al.* (1994) e SCHNEIDER (2006) e similar ao ensaio A.

Assim como no ensaio anterior (ensaio C), este cultivo, suplementado com hidrolisado amiláceo, soro de queijo e óleo de soja, também apresentou uma segunda velocidade específica de crescimento, entretanto neste ensaio acredita-se que esta segunda fase exponencial tenha sido provocada em maior grau pelo óleo de soja, seguido pelos demais suplementos (soro de queijo e hidrolisado amiláceo). A fase foi iniciada após 39 h de cultivo, com μ de $0,18 \text{ h}^{-1}$.

FUKUI & DOI (1998), estudando *C. necator* cultivada em diversos óleos vegetais (oliva, milho, palma e ácido oléico) como suplementos em meio mineral limitado em nitrogênio, reportaram valores de XT de $3,6 - 4,3 \text{ g.L}^{-1}$ com maior porcentagem de P(3HB) acumulado; e TSUGE *et al.* (2004) citados por DELGADO (2006), apresentaram um valor de XT de $3,2 \text{ g.L}^{-1}$ e 83 % de teor de PHA utilizando também *C. necator* e óleo de soja como suplemento.

Observa-se, através das figuras 4.15 e 4.16, que representam os ensaios B e C, que houve um aumento bastante significativo da biomassa (XT) após a adição da solução alimentadora de glicose/frutose, no entanto, neste último cultivo (ensaio D), apresentado na figura 4.17, por volta de 70 h de cultivo, este comportamento referente à alimentação de solução de fonte de carbono não foi observado. Isto decorre do fato de alimentação ter sido feita de forma excessiva ficando acima de 60 g.L^{-1} , o que acarretou em um período de declínio da concentração de biomassa (XT), justamente em virtude da presença em excesso de fonte de carbono no meio. IENCZAK (2006) observou que concentrações de açúcares redutores totais acima de 40 g.L^{-1} começavam a causar inibição do crescimento de *Cupriavidus necator* da mesma forma que OLIVEIRA (1999) registrou que em valores abaixo de 10 g.L^{-1} ocorria limitação no crescimento desta bactéria. Segundo KIM e colaboradores (1994), *C. necator* utiliza glicose eficientemente como fonte de carbono com uma velocidade específica máxima de crescimento de $0,23 \text{ h}^{-1}$, em concentrações de glicose em torno de 20 g.L^{-1} .

Um resumo dos dados e fatores de conversão da fase de crescimento dos cultivos limitados em nitrogênio e com maior quantidade de suplementos encontram-se apresentados na tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Resumo da fase de crescimento para os demais experimentos

Ensaio	Composição (H, S, OS) (%)	Tempo total de crescimento (h)	Biomassa total – XT (g.L ⁻¹)	Substrato consumido (g.L ⁻¹)	Y _{XT/S} (g.g ⁻¹) ^a	Nitrogênio consumido (g.L ⁻¹)	Y _{XT/N} (g.g ⁻¹) ^b
A	0, 0, 0	11	3,3	5,62	0,39	0,16	13,45
B	100, 0, 0	32	5,8	9,19	0,41	0,16	24,21
C	0, 50, 0	11	4,0	4,54	0,44	0,07	29,67
D	5, 5, 10	11	3,8	5,80	0,38	0,05	44,95

^a fator de conversão de substrato em biomassa total.

^b fator de conversão de nitrogênio em biomassa total.

Os resultados apresentados na tabela 4.6 mostram os fatores de conversão de substrato e nitrogênio em função da biomassa total (XT). Desta forma, durante a fase de crescimento, a qual está sendo analisada, supõe-se que não haja produção do biopolímero (concentração de P(3HB) igual ou próximo de zero), podendo-se realizar uma comparação indireta entre estes fatores de conversão com os fatores de conversão obtidos por outros autores em seus estudos que utilizam os valores de biomassa residual (X_r), dado pela concentração celular (XT) menos a concentração de P(3HB)).

Conforme a tabela 4.6, verifica-se que o ensaio em que se obteve maior concentração celular de *Cupriavidus necator* (XT igual a 5,8 g.L⁻¹) e que este micro-organismo mais consumiu substrato (9,19 g.L⁻¹) durante a fase de crescimento, foi composto por 100 % de hidrolisado amiláceo (ensaio B) apresentando um fator de conversão de substrato em células de Y_{XT/S} = 0,41 g.g⁻¹, contudo, a conversão de substrato em células mais eficiente foi a do ensaio C, Y_{XT/S} = 0,44 g.g⁻¹ o qual apresentava 50 % de soro de queijo em sua composição, seguido pelos demais ensaios (B, A e D) com Y_{XT/S} iguais a 0,41 g.g⁻¹, 0,39 g.g⁻¹ e 0,38 g.g⁻¹, os quais apresentaram valores bem próximos.

FARIAS (2009) para a produção de poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) por *Cupriavidus necator* obteve fatores de conversão de substrato em célula (Y_{Xr/S}) 0,52 e 0,48 g.g⁻¹ em seus dois experimentos. Entretanto, em meio padrão a 35°C, FIORESE (2008) obteve Y_{Xr/S} na fase de crescimento igual a 0,33 g.g⁻¹, semelhantemente, IENCZAK (2011) obteve Y_{Xr/S} de 0,34 g.g⁻¹.

A determinação dos valores do fator de conversão de nitrogênio em células é muito importante para definir a extensão da replicação celular sendo isto fundamental em um processo onde o acúmulo do polímero ocorre sob condições limitadas de nutrientes (FIORESE, 2008).

No cultivo padrão (ensaio A), obteve-se um fator de conversão ($Y_{XT/N}$) de 13,45 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, valor este próximo aos citados por REPASKE & REPASKE (1976) e ARAGÃO (1996) que obtiveram um fator de conversão ($Y_{Xr/N}$) de 8,33 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, FIORESE (2008) que obteve um fator de conversão ($Y_{Xr/N}$) de 8,2 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, e IENCZAK (2011) $Y_{Xr/N}$ de 8,6 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Os demais ensaios (B, C e D) por conterem suplementos em sua composição, apresentaram valores dos fatores de conversão muito superiores ao padrão: ($Y_{XT/N}$) de 24,21 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 29,67 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e 44,95 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente, isto ocorre devido aos suplementos apresentarem em sua composição nitrogênio sob outras formas, além de imprimirem coloração ao meio. Como já mencionado anteriormente, a determinação da concentração de nitrogênio é realizada de forma colorimétrica expressando valores qualitativos, o que provoca valores de conversão incoerentes com os citados pela literatura.

Com relação às análises de determinação e produção de poli (3-hidroxi butirato) em alguns pontos selecionados durante o período de cultivo destes quatro ensaios, foi possível visualizar conforme os cromatogramas (ANEXO 13, nas figuras A.13 a A.28) que não foi detectada presença de P(3HB), fazendo-se necessário o uso de novas estratégias de cultivo focadas na aeração do processo, nas análises de respirometria, lembrando que os mesmos foram desenvolvidos em recipientes de vidro adaptados, cuja forma de aeração era proporcionada apenas pela agitação dos frascos em equipamento *shaker* a 150 rpm, e o ideal seria que fossem desenvolvidos em biorreatores, que são equipamentos apropriados para este tipo de experimento.

Além disso, muitos autores que obtiveram produção de P(3HB) em seus experimentos, utilizaram algum sistema de aeração e a agitação foi bastante acima da utilizada neste experimento, como por exemplo FIORESE (2008), que utilizou 0,125 vvm - 0,9 vvm e 400 a 900 respectivamente, procurando-se assim, manter a concentração de oxigênio dissolvido superior a 20 %; FARIAS (2009), utilizou 0,5 vvm e 450 rpm respectivamente, aumentadas gradualmente até 1,5 vvm e 950 rpm, de maneira a manter a pressão parcial de oxigênio dissolvido superior a 30 % de saturação; IENCZAK (2011), 0,125 vvm e 450 rpm, sendo aumentadas gradualmente para manter-se a concentração de oxigênio dissolvido também superior a 30 % em relação à saturação com ar atmosférico.

A fonte de carbono é talvez o fator que tenha maior influência no crescimento de um micro-organismo. Contudo, neste tipo de cultivo, muitas variáveis podem afetar a

velocidade global de reação, podendo-se destacar a velocidade de transferência de massa entre as fases, as características hidrodinâmicas do reator e os parâmetros cinéticos intrínsecos. Em muitos sistemas aeróbios, a disponibilidade de oxigênio para os microorganismos depende da transferência de massa, bem como da velocidade com que o oxigênio dissolvido é utilizado. Por causa da sua baixa solubilidade na água, a velocidade de transferência de oxigênio desde a bolha de gás até as células pode ser o fator limitante, que vai determinar a velocidade de conversão biológica (KARGI & MOO-YOUNG, 1985), e desta forma, maior ou menor produção de P(3HB).

Acredita-se que a respirometria como grandeza indicativa da produção do biopolímero seja mais precisa do que a análise de nitrogênio por *kit* colorimétrico, permitindo, assim, um melhor acompanhamento da cultura e do seu estado fisiológico e possibilitando a identificação das fases de crescimento e produção de P(3HB) por *Cupriavidus necator*.

Ainda que não se tenha conseguido resultados de produção de P(3HB) nos cultivos desenvolvidos, foi possível obter resultados positivos e plausíveis quanto ao desenvolvimento de *Cupriavidus necator* utilizando resíduos das indústrias processadoras de alimentos e uma matéria-prima de fonte renovável como suplementos, evidenciando assim, a possibilidade de diminuição nos custos do processo, no que se refere à fonte de carbono.

5.0 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Este trabalho teve como objetivo geral desenvolver estratégias de crescimento de *Cupriavidus necator* visando à produção de poli (3-hidroxi-butirato) utilizando resíduos das indústrias de alimentos (bagaço de mandioca hidrolisado e soro de queijo) e de fonte renovável (óleo de soja) como suplementos nutricionais.

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- A caracterização dos resíduos das indústrias de alimentos apontou a viabilidade dos mesmos serem utilizados como nutrientes pelo micro-organismo para seu crescimento celular;
- Através do planejamento experimental foi possível observar o crescimento do *C. necator* nos cultivos utilizando suplementos, uma vez que as velocidades específicas de crescimento foram próximas da faixa encontrada na literatura, também foi possível avaliar a influência dos suplementos na fase de crescimento de *C. necator* visando à produção de P(3HB);
- Na faixa estudada do planejamento experimental, não houve resultados significativos, indicando que a utilização de quaisquer destes três suplementos (hidrolisado, soro de queijo e óleo de soja) não influencia a resposta;
- O melhor resultado para produção de biomassa foi obtido no experimento onde as concentrações de suplementos encontravam-se em seus níveis centrais (5 % H + 5 % S + 5 % OS), seguido pelos ensaios que continham os suplementos soro de queijo e óleo de soja combinados (10 % S + 10 % OS) ou somente a presença de um destes dois componentes (10 % S e 10 % OS);
- Nos quatro experimentos utilizando concentrações maiores de suplemento e limitação da fonte de nitrogênio os resultados obtidos mostram que, no cultivo contendo 100% de hidrolisado amiláceo ocorreu a maior produção de biomassa celular (5,8 g.L⁻¹) no momento da limitação do nutriente nitrogênio;
- A conversão de substrato em células, obtida nos experimentos com aumento da concentração de suplemento, dada por $Y_{XT/S}$, foi mais eficiente no cultivo

que continha maior quantidade do suplemento soro de queijo (50 % - $Y_{XT/S}$ de $0,44 \text{ g.g}^{-1}$).

- Não foi possível a obtenção da produção de P(3HB) nos cultivos desenvolvidos, contudo foi possível obter resultados positivos e plausíveis quanto ao desenvolvimento de *Cupriavidus necator* utilizando resíduos e óleo de soja.

Como conclusão final deste trabalho, tem-se que a utilização de resíduos das indústrias de alimentos é uma alternativa viável para o crescimento de *C. necator* e, por conseguinte, produção de poli (3-hidroxibutirato), conseguindo-se assim, redução nos custos do processo a fim de torná-los mais competitivos no mercado, além do benefício de redução no tratamento destes resíduos e da valorização dos mesmos. A utilização de óleo de soja, apesar de não ser um resíduo, é extremamente promissora, pois trata-se de uma fonte renovável.

Com base nos resultados apresentados é possível deixar algumas sugestões para os próximos estudos sobre este assunto:

- Através da análise estatística, verificou-se que a curvatura é significativa. Desta forma, o ideal seria ampliar o fatorial, adicionando pontos axiais ao planejamento, ou seja, para três fatores, seriam necessários seis ensaios, considerando os níveis zero e $\pm 1,68$.

$$\text{Nível: } \alpha = 2^{K/4} \quad k = n^{\circ} \text{ fatores} = 3 \quad \alpha = 2^{3/4} = 1,68$$

Desenvolvendo-se estes seis novos ensaios seria possível obter uma curva com um ponto de máximo como sugerido pelo; planejamento analisado e a partir da curvatura;

- Desenvolver estratégias de cultivo utilizando estes mesmos resíduos porém, aumentando-se a agitação no meio, associadas a um sistema de aeração, como sugestão a utilização de um equipamento biorreator;
- Realizar análise respirométrica de forma a obter o ponto de limitação da fonte de nitrogênio;
- Testar outros resíduos das indústrias processadoras de alimentos, tais como palha de milho, casca de soja, casca de frutas, entre outros, como suplementos para crescimento de *C. necator* visando à produção de P(3HB).

REFERÊNCIAS

- ABIPLAST. Associação Brasileira da Indústria do Plástico. **Informativo 2010**. Disponível em: <<http://www.abiplast.org.br>>. Acesso em: 22 fev. 2011.
- ABIOVE. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. Disponível em: <http://www.abiove.com.br/menu_br.html>. Acesso em: 07 out. 2011.
- ABIQ. Associação Brasileira dos Produtores de Queijo. Disponível em: <<http://www.abiq.com.br>>. Acesso em: 05 dez. 2011.
- ABRAHÃO, José Jorge dos Santos. Bagaço da mandioca gerado em fecularias alimenta bovinos de corte. *Revista ABAM*, ano III, nº 11, 2005. Disponível em: <<http://www.abam.com.br/revista/revista11/iapar.php>>. Acesso em: 05 mai. 2011.
- ALMEIDA, E.; DURAN, N. **Resumos I Fórum das Universidades Públicas Paulistas: Ciência e Tecnologia em Resíduos**. São Pedro, 2003.
- AMPE, F. **Métabolism du benzoate chez *Alcaligenes eutrophus*: quels mécanismes physiologiques régulent la biodégradation des composés aromatiques?**. Toulouse: L'Institut National des Sciences appliquées de Toulouse. 1995. 237 p. Tese (Doutorado).
- ANTONOPOULOU, G.; STAMATELATOU, K.; VENETSANEAS, N.; KORNAROS, M.; LYBERATOS, G. **Biohydrogen and methane production from cheese whey in a two-stage anaerobic process**. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 47, p. 5227-5233, 2008.
- APHA (American Public Health Association); AWWA (American Water Works Association); WEF (Water Environment Federation). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 21ª Ed. Washington – DC: APHA, 2005.
- ARAGÃO, G. M. F. **Production de polyhydroxyalcanoates par *Alcaligenes eutrophus*: caractérisation cinétique et contribution à l'optimisation de la mise en oeuvre des cultures**. Toulouse: L'Institut National des Sciences appliquées de Toulouse, 1996. Tese (Doutorado).
- BRANDÃO, S. C. C. **Soro: um desafio para as fábricas de queijo**. *Leite & Derivados*, v. 15, p. 13-18, 1994.
- BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. **Plastics from bacteria and for bacteria: poly(3-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters**. *Biochemical Engineering and Biotechnology*, v. 41, pp. 77-93, 1990.
- BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. **Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects**. *Journal of Biotechnology*, v. 65, p. 127-161. 1998.
- BUTRIAGO, J. A. A. **La yuca en la alimentación animal**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1990. 446p.
- BYROM, D. **Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics**. *Tibtech*, v. 5, p. 246-250, 1987.
- CAMARGO, D. S.; ALVES, G.; GARCIA, S. **Bebida fermentada à base de soro de leite e isolado protéico de soja**. *Semina*, v. 21, p.45-51, 2000.

- CARDOSO, Éria. **Uso de manipueira como biofertilizante no cultivo do milho: avaliação do efeito no solo, nas águas subterrâneas e na produtividade do milho.** Criciúma, SC: Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Universidade do Extremo Sul Catarinense, 2005. 67 p. Tese (Mestrado).
- CEREDA, M. P. **Caracterização dos resíduos da industrialização da mandioca.** In: Resíduos da industrialização da mandioca no Brasil. São Paulo: Paulicéia, 1994. cap. 1, p.11-50.
- CEREDA, M. P. **Caracterização dos subprodutos da industrialização da mandioca.** Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. São Paulo : Fundação Cargill, v.4, cap.1, p. 13-37, 2001.
- CEREDA, M. P. **Valorização de resíduos como forma de reduzir custos de produção.** In: Congresso Brasileiro de Mandioca, 1996. Águas de São Pedro, **Anais do Congresso Brasileiro de Mandioca.** Botucatu: CERAT, v. 1, 1996.
- CHANDRA, R; RUSTIGI, R. **Biodegradable Polymers.** *Program, Polymer Science*, Grã Bretanha, n.23, p. 1273-1335. 1998.
- CHOI, J.; LEE, S. Y. **Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 51, p. 13-21, 1999.
- DALCANTON, F. **Produção, extração e caracterização de poli (3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* em diferentes substratos.** Florianópolis, SC: Centro Tecnológico. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC, 2006. 132 p. Tese (Mestrado).
- DALCANTON, F.; IENCZAK, J. L.; FIORESE, M. L.; ARAGÃO, G. M. F. **Produção de poli (3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator* em meio hidrolisado de amido de arroz com suplementação de óleo de soja em diferentes temperaturas.** *Química Nova*, v. 33(3), p. 552-556. 2010.
- DAWES E. A.; SENIOR P. J. **The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms.** *Adv. Microb. Physiol.*, v.10, p.135-266. 1973.
- DELGADO, Cecília Claudia Romero. **Estudo da Biossíntese de Poli-3-hidroxibutirato (P3HB) a partir de Óleo de Soja.** São Paulo, SP: Instituto de Ciências Biomédicas, USP, 2006. 114 p. Tese (Mestrado).
- DUARTE, M. A. T.; C. F. JÚLIO; E. S. MARTINS; S. H. PEZZIN. **Estudo da Compactação a Frio de Poli (3-Hidroxibutirato)-Morfologia e Resistência à Compressão.** *Revista Matéria*, v. 9, p. 386-391, 2004.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 07 out. 2011.
- FARIAS, Daniele. **Produção e caracterização de poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por *Cupriavidus necator* em melaço cítrico.** Florianópolis, SC: Centro Tecnológico. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC, 2009. 195 p. Tese (Mestrado).
- FEIDEN, A.; CEREDA, M. P. **Potencial energético do biogás gerado no tratamento de águas residuárias de feculárias em sistema piloto de biodigestão anaeróbia com separação de fases.** *Energia na Agricultura*, Botucatu, v.18, n.2, p.54-66, 2003.

- FINKLER, Leandro. **Utilização do potencial de óxido-redução para o monitoramento de culturas de *Ralstonia eutropha* visando a produção de polihidroxibutirato.** Florianópolis, SC: Centro Tecnológico. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC, 2002. 78 p. Tese (Mestrado).
- FIGLIARELLI, Mônica Lady. **Avaliação do crescimento de *Ralstonia eutropha* em resíduo da indústria de alimentos para a produção de poli-hidroxibutirato.** Florianópolis, SC: Centro Tecnológico. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC, 2004. 107 p. Tese (Mestrado).
- FIGLIARELLI, Mônica Lady. **Estratégias de cultivo e recuperação e caracterização de poli (3-hidroxibutirato) produzido por *Ralstonia eutropha*.** Florianópolis, SC: Centro Tecnológico. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, UFSC, 2008. 180 p. Tese (Doutorado).
- FONSECA, G. G. **Produção de polihidroxialcanoatos por *Escherichia coli* recombinante.** Florianópolis, SC: Centro Tecnológico. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC, 2003. 154 p. Tese (Mestrado).
- FONSECA, V. De C. Da. **Elaboração de molho para salada com soro de queijo minas frescal estabilizado por combinações ternárias de alginato de propileno glicol, goma xantana e carboximetilcelulose.** Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2008. Tese (Mestrado).
- FORNARI, R, C, G. **Aproveitamento do soro de queijo para a produção de goma xantana.** Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, RS, 2006. 90 p. Tese (Mestrado).
- FRANCHETTI, Sandra Mara Martins; MARCONATO José Carlos. **Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos.** *Quim. Nova*, Vol. 29, n. 4, 811-816, 2006.
- FUKUI, T.; DOI, Y. **Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain.** *Applied Microbiol Biotechnol.*, v. 49, p. 333-336. 1998.
- FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. **Tecnologia de queijos: manual técnico para a produção industrial de queijos.** São Paulo: Dipemar, 1994. p.76-77.
- GABARDO, Sabrina. **Otimização da bioconversão de lactose do soro de queijo em etanol em sistemas de biorreatores imobilizados.** Porto Alegre, RS: Instituto Tecnológico. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFRGS, 2011. 85 p. Tese (Mestrado)
- GARBOSA, F. G.; TRINDADE, J. L. F. da. **Bioconversão de resíduos agroindustriais – uma revisão.** *Série em Ciência e Tecnologia de Alimentos: Agroindústria, Energia e Meio Ambiente.* UTFPR, Campus Ponta Grossa, 2008.
- GARCIA, Michele Cristina Formolo. **Desenvolvimento de um processo de extração de poli (3-hidroxibutirato) produzido por *Cupriavidus necator* e seu efeito sobre as características do polímero.** Florianópolis, SC: Centro Tecnológico. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC, 2006. 138 p. Tese (Mestrado).
- GOMEZ, J. G. C.; BUENO NETO, C. L. **Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias.** *Revista Brasileira de Engenharia Química.* v. 17, p. 24-29, 1997.

- GOMEZ, J. G. C.; FONTOLAN, V.; ALLI, R. C. P.; RODRIGUES, M. F. A.; BUENO NETTO, C. L.; SILVA, L. F.; SIMÕES, D. A. **Production of P3HB-co-3HV by soil isolated bacteria able to use sucrose.** *Rev Microbiol*, 28 (Suppl. 1), p. 43-48. 1997.
- GROTHER, E.; MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y. **Fermentation optimization for the production of poly(b-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic.** *Enzyme and Microbial Technology*, 25, p. 132-141. 1999.
- HÄNGGI, U.J. **Requirements on bacterial polyesters as future substitute for conventional plastics for consumer goods.** *FEMS Microbiol. Reviews*. 16, 213-220. 1995.
- HANSEN, K.; ANGELIDAKI, I.; AHRING, B. K. **Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia.** *Water Research*. v. 32, p. 5-12. 1998.
- HUANG, S. J.; EDELMAN, P. G.; **Degradable Polymers: Principles and Applications.** *Chapman & Hall*. London. 1995.
- IENCZAK, Jaciane Lutz. **Estratégia de cultivo em alta concentração celular para a produção de Poli (3-hidroxibutirato) em substratos com moderada concentração da fonte de carbono.** Florianópolis, SC: Centro Tecnológico. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC, 2011. 71 p. Tese (Doutorado).
- IENCZAK, Jaciane Lutz. **Valorização do resíduo industrial com a produção de Poli (3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator*.** Florianópolis, SC: Centro Tecnológico. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC, 2006. 92 p. Tese (Mestrado).
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** São Paulo: IMESP, 3ª ed., v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 1985. p. 533.
- IST - INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO – Grupo de ciências biológicas. **Acompanhamento da curva de crescimento - Análise espectrofotométrica da Densidade Óptica (D.O.) de uma cultura microbiana.** 2005. Disponível em: <<http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=235&ordem=4>>. Acesso em: 25 nov. 2011.
- KAHAR, P.; TSUGE, T.; TAGUCHI, K.; DOI, Y. **High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain.** *Polymer Degradation and Stability*, v. 83. P. 79-86. 2004.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. **Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates.** *Process Biochemistry*, v. 40, p. 607-619. 2004.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. **Computer simulated fed-batch cultivation for over production of PHB: a comparison of simultaneous and alternate feeding of carbon and nitrogen.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 27, p.197-203, 2005.
- KARGI, F.; MOO-YOUNG, M. **Transport phenomena in bioprocess.** In. *Comprehensive Biotechnology*, 1ª edição, Pergamon Press, v. 2, p. 5-56. 1985.
- KIM, B. S. **Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates.** *Enzyme Microbiology and Technology*, v. 27, p. 774-777. 2000.
- KIM, B. S.; LEE, S. C; LEE, S.Y.; CHANG, H. N.; CHANG, Y.K.; WOO S. I. **Production of polyhydroxybutyrate by fed batch with glucose concentration control in *Ralstonia eutropha*.** *Biotechnology Bioeng*, v. 43, p. 892-898. 1994.

- KIM, B. S.; LEE, S. Y.; CHANG, H. N. **Production of polybetahydroxybutyrate by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*.** *Biotechnology Letters*, v. 14, p. 811-816. 1992.
- KIM, H. O.; WEE, Y. J.; KIM, J. N.; YUN, J. S.; RYU, H. W. **Production of lactic acid from cheese whey by batch and repeated batch cultures of *Lactobacillus* sp RKY2.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 131, p. 694-704, 2006.
- KOLICHESKI, M. B. **Podução de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido Utilizando como Substrato Bagaço de Mandioca.** Curitiba, PR: Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, UFPR, 1995. 137 p. Tese (Mestrado).
- KRUEGER, Cristhiane Leite. **Seleção de linhagens de *Bacillus* produtoras de polihidroxicanoatos a partir de resíduo do processamento de mandioca.** Florianópolis, SC: Centro Tecnológico. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC, 2009. 98 p. Tese (Mestrado).
- 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(3), p. 240-245. 2009.
- KUMAR, M. S.; MUDLIAR, S. N.; REDDY, K. M. K.; CHAKRABARTI, T. **Production of biodegradable plastics from active sludge generated from a food processing industrial wastewater treatment plant.** *Bioresource technology*, v. 95, p. 327-330. 2004.
- LAMAISON, F. do C. **Aplicação da água residuária do processamento da mandioca como substrato para a produção de hidrogênio por processo fermentativo.** Florianópolis, SC: Centro Tecnológico. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC, 2009. 83 p. Tese (Mestrado).
- LAMO, P. R.; MENEZES, T. J. B. **Bioconversão das águas residuais do processamento da mandioca para a produção de biomassa.** Col. ITAL, v. 10. p. 1-14. 1979.
- LEE, S. Y. **Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria.** *Tibtech*, v. 14, p. 431-438. 1996.
- LEE, S. Y.; PARK, S. H.; HONG, S. H.; LEE, Y.; LEE, S. H. **Fermentative production of building blocks for chemical synthesis of polyesters.** In: STEINBÜCHEL, A. & DOI, Y. *Biopolymers*. v.3b. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.
- LEWANDOWSKA, M.; KUJAWSKI, W. **Ethanol production from lactose in a fermentation/pervaporation system.** *Journal of Food Engineering*, v. 79, p. 430-437, 2007.
- LUENGO, J.; GARCIA.; SANDOVAL, A.; NAHARRO, G; OLIVEIRA, E. **Bioplastics from microorganisms.** *Current Opinion in Microbiol.*, v.6, p.251-260, 2003.
- MACKERETH, F. J. H.; HERON, J.; TALLING, J. F. **Water analysis: some revised methods for limnologists.** *Scientific Publication*, v. 36. Cumbria, 1978. 120 p.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. B. **Biology of Microorganisms,** *Prentice-Hall International Editions*, Upper Saddle River, 2000.
- MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. **Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic.** *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 63, n. 1, p. 21-53, 1999.

- MARANGONI, C. **Estudo de estratégias de produção de Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por *Ralstonia eutropha* utilizando substratos de baixo custo e ácido propiônico.** Florianópolis, SC: Centro Tecnológico. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC, 2000. 191 p. Tese (Mestrado).
- MARANGONI, C.; FURIGO, Jr, A.; ARAGÃO, G. M. F. **Oleic acid improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Ralstonia eutropha* in inverted sugar and propionic acid.** *Biotechnology Letters*, v. 22, p. 1635-1638. 2000.
- MARANGONI, C.; FURIGO, Jr, A.; ARAGÃO, G. M. F. **Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding.** *Process Biochemistry*, v. 38, p. 137-141. 2002.
- MESOMO, M.; SILVA, M. F.; BONI, G. **Xanthan gum produced by *Xanthomonas campestris* from cheese whey: production optimisation and rheological characterisation.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 89, p. 2440-2445, 2009.
- MILLER, G. L. **Analytical Chemistry.** v. 31, p. 426-428, 1959.
- MIRALLES, J. **Ecologia Para Organizações Juvenis.** Lisboa: APCC, 1999.
- MORESI, M. **Cost/benefit analysis of yeast and yeast autolysate production from cheese whey.** *Italian Journal of Food Science*, v. 6, p. 357-370, 1994.
- NAJAFPOUR, G. D.; KOMEILI, M.; TAJALLIPOUR, M.; ASADI, M. **Bioconversion of cheese whey to methane in an upflow anaerobic packed bed bioreactor.** *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, v. 24, p. 111-117, 2010.
- NETTO, Celso Lellis Bueno. PHB – Plástico Biodegradável. Galeria de inventores brasileiros. Disponível em: <<http://www.redetec.org.br/inventabrasil/plastico.htm>>. Acesso em: 05 mai. 2011.
- NEVES, M. F. **Mapeamento do Sistema Agroindustrial do leite.** Projeto da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo - Câmara Setorial de Leite e Derivados. 2005.
- NONATO, R. V.; MANTELATTO, P. E.; ROSSELL, C. E. V. **Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 57, p.1-5. 2001.
- NORMANHA, E. S. **Derivados da mandioca: terminologia e conceitos.** Fundação Cargil, Campinas, 1982. 56 p.
- OLIVEIRA, M. E.; NOGUEIRA, M. H. **Biogás: Uma energia de alternativa.** Lisboa. Laboratório Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial. Departamento de energias renováveis. 1984.
- OLIVEIRA, R. **Produção de poli-3-hidroxibutirato (P(3HB)) por *Ralstonia eutropha* em substrato de baixo custo: Estudos de diferentes estratégias de limitação de crescimento.** Florianópolis, SC: Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, UFSC, 1999. 100 p. Tese (Mestrado).
- ORNELAS, A. P.; SILVEIRA, W. B.; SAMPAIO, F. C.; PASSOS, F. M. L. **The activity of beta-galactosidase and lactose metabolismo in *Kluyveromyces lactis* cultures in cheese whey as function of growth rate.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 4, p. 1008-1013, 2008.

- OTAKE, Y.; KOBAYASHI, T.; ASBE, H.; MURAKAMI, N.; ONO, K. **Biodegradation of low-density polyethylene, polystyrene, polyvinyl chloride and urea formaldehyde resin buried under soil for over 32 years.** *J. Appl. Polym. Sci.* n° 56, 1995.
- PANDEY, A. **Concise encyclopedia of bioresource technology.** Food Products Press, New York, 2004.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHEL, D. **New developments in solid state fermentation: I – bioprocess and products.** *Journal Process Biochemistry.* v. 35, p. 1153-1169. 2000.
- PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F.; GANDHI, D. N.; BUNKO, K. **Bioutilisation of whey for lactic acid production.** *Food Chemistry,* v. 2, p. 1-14, 2007.
- PAOLUCCI, A. A. P. **Formulação de um meio de cultura a base de soro de queijo para produção de *Lactococcus lactis* sp *Lactis*.** Viçosa, MG: UFV, 1991. Tese (Mestrado).
- PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. de O. **Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental.** *Journal Technology Manag. Innov.* v. 2, Issue 1. 2007.
- PIEMOLINI, L. T. **Modelagem estrutural da PHA sintase de *Choromobacyerium violaceun* para estudos de mutação sítio-dirigida.** Florianópolis, SC: Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, UFSC, 2004. Tese (Mestrado).
- POIRIER, Y.; NAWRATH, C.; SOMERVILLE, C. **Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastic and elastomers, in bacteria and plants.** *Bio/Technology,* v. 13, p. 142-150, 1995.
- PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F. E.; CASTRO GOMES, R. J. H. **Soro de leite – Obtenção, características e aproveitamento: revisão.** *Seminário Cia. Agr.,* Londrina, v. 13, n.1, p. 92-96. 1992.
- QUINES, Luci Kelin de Menezes. **Extração de poli (3-hidroxi-butirato) produzido por *Cupriavidus necator* dsm 545 com 1,2-carbonato de propileno.** Florianópolis, SC: Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC, 2010. 99 p. Tese (Mestrado).
- RAMADAS, N. V.; SINGH, S. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. **Polyhydroxybutyrate production using agro-industrial residue as substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149.** *Brazilian Archives of Biology and Technology,* v. 52(1), p. 17-23. 2009.
- RAMSAY, B. A.; RAMSAY, J. A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; BATAILLE, P. **Production of poly-(β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric) acid copolymers.** *Applied Environmental Microbiology,* v. 56, p. 2093-2098, 1990.
- RECH, R.; AYUB, M. A. Z. **Fed-batch bioreactor process with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* growing on cheese whey.** *Brazilian Journal of Chemical Engineering,* v. 23, p. 435-442, 2006.
- REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; KALIA, V. C. **Polyhydroxyalkanoates: an overview.** *Bioresource Technology,* v. 87, p. 137-146. 2003.
- REPASKE, R.; REPASKE, A. C. **Quantitative requirements for exponential growth of *Alcaligenes eutrophus*.** *Appl. Environ. Microbiol.* 32 (4): 585-591, 1976.
- RETO, Maria Aparecida de Sino. **Plástico Biodegradável.** *Revista Plástico Moderno,* n. 432, out 2010. Disponível em <<http://www.plastico.com.br/reportagem.php?rrid=53>>. Acesso em: 04 mai. 2011.

- REVISTA PLÁSTICO MODERNO (2002). **Perspectivas 2003 – Embalagens**. *Revista Plástico Moderno*. Disponível em <<http://www.plastico.com.br/plastico.htm>>. Acesso em: 04 mai. 2011.
- RODRIGUES, Alexandre Dantas. **Estudo da produção de poli-hidroxibutirato por *Cupriavidus necator* em fermentação no estado sólido**. Rio de Janeiro, RJ: Programa de Engenharia Química da COPPE, UFRJ, 2005a. 87 p. Tese (Mestrado).
- RODRIGUES, Rafael Costa. **Condições de cultura para a produção de poli (3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* a partir de resíduos de indústrias de alimentos**. Florianópolis, SC. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, UFSC, 2005b. 90 p. Tese (Mestrado).
- RODRIGUES, M. F. de A. **Plásticos Biodegradáveis**. IPT. São Paulo, 2002. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/noticentro/2007/08/maria_filomena.pdf>. Acesso em: 08 ago. 2011.
- ROSA, D. S.; LOTTO, N. T.; GUEDES, C. G. F. *Polym. Test*, 23, 3. 2004.
- SANTOS, C. E. O.; RODRIGUES, T. C.; ROSA, D. S.; CALIL, M. R. O efeito da irradiação UV – B na biodegradação dos polímeros PCL e PHB. In: 6º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2001, Belo Horizonte. **Anais do 6º Congresso Brasileiro de Polímeros**.
- SCHNEIDER, A. L. S. **Síntese, caracterização e biodegradação de poli-3-hidroxibutirato obtido por *Ralstonia eutropha***. Florianópolis, SC: Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, UFSC, 2006. 220 p. Tese (Doutorado).
- SENIOR, P. J.; DAWES, E. A. **Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii***. *Biochem. Journal*, v. 125, p. 55-66. 1971.
- SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; ROCHA, R. C. S.; TACIRO, M. K.; PRADELLA, G. da C. **Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil**. *Química Nova*, v. 30, n. 7. 2007.
- SILVA, L. F.; TACIRO, M. K.; PRADELLA, J. G. C.; GOMEZ, J. G. C. **Fábrica viva de plástico biodegradável**. *Ciência Hoje*, RJ, v. 29, n. 174, p. 69-71, 2001.
- SILVA, M. F.; FORNARI, R. G.; MAZUTTI, M.; OLIVEIRA, D.; PADILHA, F.; CICHOSKI, A.; CANSIAN, R.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. **Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source**. *Journal of Food Engineering*, v. 90, p. 119-123, 2009.
- SILVEIRA, W.; PASSOS, F. J.; MANTOVANI, H.; PASSOS, F. M. **Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux of oxidoreductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen level**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, p. 141-209, 2005.
- SQUIO, C. R. **Estratégias de Alimentação e Utilização de Suplementos Nutricionais na Produção de Poli (3-Hidroxibutirato-co-3-Hidroxivalerato) por *Ralstonia eutropha***. Florianópolis, SC: Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, UFSC, 2003. 161 p. Tese (Mestrado).
- SQUIO, C. R.; ARAGÃO, G. M. F. **Estratégias de cultivo para a produção dos plásticos biodegradáveis poli (3-Hidroxibutirato) e poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por bactérias**. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 615-622. 2004.

- STEINBÜCHEL, A. **P(3HB) and other polyhydroxyalkanoic acids**. *Products of primary metabolism*, v. 6, Biotechnology, VCH, p. 403-464. 1996.
- STEINBÜCHEL, A.; FÜCHTENBUSCH, B. **Bacterial and other biological systems for polyester production**. *Tibtech*, v. 16, p. 419-427, 1998.
- STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H.E. **Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids**. *FEMS Microbiol. Letter*, v. 128, p. 219-228, 1995.
- STICKLAND, L. H. **The determination of small quantities of bacteria by means of biuret reaction**. *J. Gen. Microbiol.* v. 5, p. 698-703. 1951.
- SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. **Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters**. *Progress in Polymer Science*, v. 25, p. 1503- 1555, 2000.
- SUTHERLAND, I. **A sticky business: microbial polysaccharides: current products and future trends**. *Microbiology Today*, v. 29, p. 70-71, 2002.
- TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L. M. **Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais**. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, n.1, p.243-250, 2008.
- TIAN, J., SINSKEY, A. J, and STUBBE, J. **Kinetic Studies of Polyhydroxybutyrate Granule Formation in *Wautersia eutropha* H16 by Transmission Electron Microscopy**. *Journal of Bacteriology*, p. 3814-3824, 2005.
- TSUTSUMI, C. Y. **Saúde em Soja**. Informativo Científico da FAPEPI. Piauí, 2004. Disponível em: <<http://www.fapepi.pi.gov.br/novafapepi/sapiencia4/artigos3.php>>. Acesso em: 10 dez. 2011.
- USP – Instituto de Ciências Biomédicas. **Crescimento bacteriano**. São Paulo, 2009. Disponível em: <http://www.icb.usp.br/bmm/grad/arquivos/BMM_0122_2009/aula_T8/crescimento%20e%20controle%201.pdf>. Acesso em: 08 ago. 2011.
- WOICIECHOWSKI, A. L. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de xantana a partir de resíduos agroindustriais de café e de mandioca**. Curitiba, PR: Processos Biotecnológicos, UFPR, 2001. 100 p. Tese (Doutorado).
- VERHOOGT, H.; RAMSAY, B. A.; FAVIS, B. D. **Polymer Blends containing poly (3-hydroxybutarate)**. *Polymer*, v.35, nº 24, p. 5155-5169. 1994.
- VOLOVA, T. G. **Polyhydroxyalkanoates – Plastic Material of the 21st Century: Production, Properties and Application**. *Nova Publishers*, New York, 1 ed. 282 p. 2004.
- ZENI, G.; PENDRAK, I.P. **Bion conversão de celulose em proteína utilizando a levedura *Cândida utilis* e o fungo *Pleurotus ostreatus***. Ponta Grossa, PR: Universidade Federal Tecnológica do Paraná, 2006. Tese (Graduação).

ANEXOS

ANEXO 01

Determinação da alcalinidade

Os sólidos presentes na amostra foram separados por centrifugação a 1000 rpm / 10 min. em uma centrífuga de tubos (modelo T-0603, marca Parsec). Após centrifugação 20 mL do sobrenadante da amostra foi transferidos para um béquer de 100 mL. Sob agitação contínua (agitador magnético), titulou-se com ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,1 N até pH 4,0. Anotou-se o volume gasto. As determinações foram realizadas em triplicata.

Calculou-se a alcalinidade total em $\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$ utilizando-se a equação A.1:

$$\text{Alcalinidade total} = \frac{\text{normalidade } \text{H}_2\text{SO}_4 * \text{volume (mL) } \text{H}_2\text{SO}_4 * 50000}{\text{volume da amostra (mL)}} \quad (\text{Eq. A.1})$$

Onde 50000 é o equivalente-grama do CaCO_3 .

ANEXO 02

Determinação da acidez

Uma alíquota de 20 mL de amostra utilizada na determinação de alcalinidade foi pipetada e colocada em um béquer de 100 mL. Sob agitação contínua, titulou-se com H_2SO_4 0,1 N até pH 3,3 – 3,5. Deixou-se ferver durante 3 minutos e em seguida resfriou-se em banho de gelo. A solução foi titulada com NaOH 0,1 N até pH 4,0. A bureta foi zerada e então novamente a solução foi titulada, desta vez até pH 7,0. Anotou-se o volume gasto. As determinações foram realizadas em triplicata.

A acidez em $\text{mg.L}^{-1} \text{CH}_3\text{COOH}$ foi calculada utilizando-se o volume gasto entre pH 4,0 até 7,0 e a equação A.2:

$$\text{Acidez} = \frac{\text{normalidade NaOH} * \text{volume (mL) NaOH} * 60000}{\text{volume da amostra (mL)}} \quad (\text{Eq. A.2})$$

Onde 60000 é o equivalente-grama do CH_3COOH .

ANEXO 03

Determinação de sólidos totais e sólidos totais voláteis

Antes de adicionar a amostra, os cadinhos foram calcinados em mufla a 550°C / 15 min. e colocados em dessecador para resfriar, sendo em seguida pesados (P₁). Após a adição de 10 mL da amostra aos cadinhos, estes foram colocados em estufa à temperatura de 105°C por 24 horas. Após este período foram colocados em dessecador e pesados novamente (P₂). Em seguida os cadinhos foram colocados em uma mufla a temperatura de 600°C/45 min., sendo retirados e colocados em dessecador para posterior resfriamento após, decorrido o tempo de aquecimento. Os cadinhos foram pesados novamente depois da calcinação e dessecador (P₃). A diferença entre os pesos 1 e 2, resultou nos sólidos totais (ST). A concentração de sólidos totais voláteis (STV) foi obtida pela diferença entre P₂ e P₃. A análise de sólidos totais e sólidos totais voláteis foi realizada em triplicata.

ANEXO 04

Determinação de açúcares redutores – Método DNS

A partir de uma solução mãe de 3 g.L⁻¹ glicose, preparou-se a curva padrão para a determinação dos açúcares redutores, nas concentrações de 0,25, 0,50, 0,75, 1,00, 1,25 e 1,50, conforme a figura A.1.

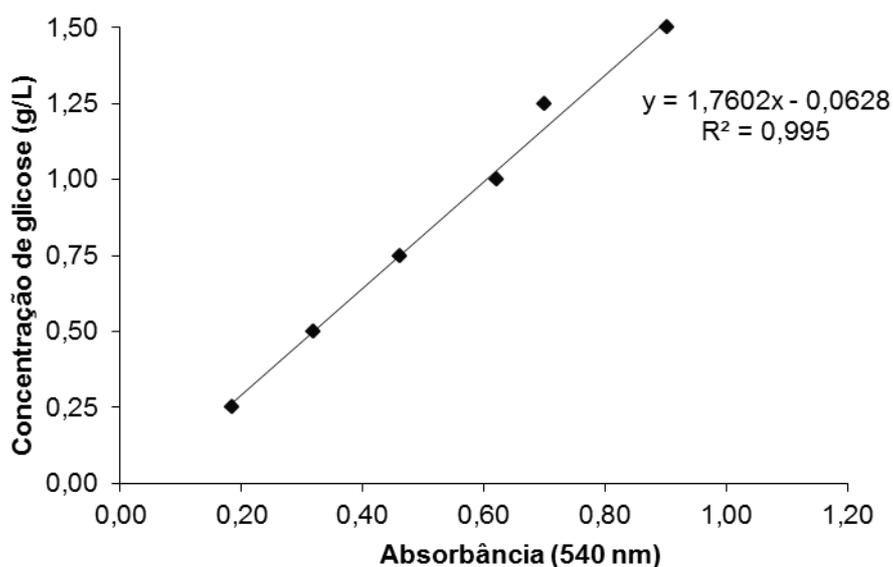


Figura A.1 - Curva de calibração para a determinação da concentração de açúcares redutores pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS)

A amostra analisada juntamente com a curva padrão foi diluída antes para 10 e 50 vezes de modo a não exceder 0,800 de absorvância no espectrofotômetro. A determinação foi realizada em triplicata através do procedimento a seguir: em tubos de ensaio devidamente identificados, foram adicionados 400 µl de amostra já devidamente diluída e 400 µl do reagente DNS quando o banho já estava a 100°C; as amostras foram postas para aquecimento, aqueceu-se por 5 minutos em banho à 100°C; imediatamente após a retirada das amostras do banho, estas foram resfriadas em um banho de gelo, às mesmas foram adicionados de 4 ml de H₂O destilada. Esperou-se 10 minutos e fez-se a leitura em espectrofotômetro (modelo UV-1800, marca Shimadzu, Japão) em comprimento de onda de 540 nm iniciando com a amostra branco.

ANEXO 05

Determinação da demanda química de oxigênio (DQO)

O procedimento é baseado no refluxo fechado por digestão ácida na presença de dicromato de potássio com 2,5 mL de amostra filtrada, realizada em um digestor a 150°C por duas horas. A quantificação é alcançada por método colorimétrico em função do dicromato consumido pela oxidação da matéria orgânica.

Foram colocados em tubos apropriados para DQO 2,5 mL de amostra, 1,5 mL de solução digestora e 3,5 mL de solução de H₂SO₄ permanecendo por 2 horas em um digestor a 150°C sendo posteriormente resfriada a temperatura ambiente e feita a leitura da absorvância em espectrofotômetro (Hitachi U-1800) a 600 nm. A concentração de DQO foi determinada a partir de uma curva padrão obtida com solução de biftalato de potássio (figura A.2).

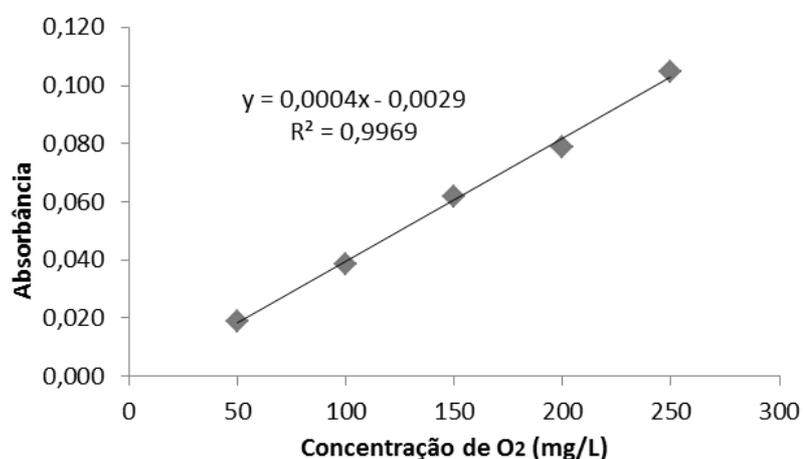


Figura A.2 - Curva padrão para a determinação da demanda química de oxigênio

As soluções utilizadas foram:

- Solução Digestora: foram adicionados a 500 mL de água destilada 10,216 g de $K_2Cr_2O_7$ previamente seco a $103^\circ C$ / 2 hrs, colocou-se 167 mL de H_2SO_4 concentrado e 33,3 g de $AgSO_4$. Dissolveu-se, resfriou-se a temperatura ambiente e diluiu-se para 1 L.

- Solução catalítica: Foram adicionados 2,53 g de $AgSO_4$ na forma de cristais ou de pó, a 250 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado a uma razão de 5,5 g de $AgSO_4$ / kg de H_2SO_4 (densidade = $1,84 \text{ kg.L}^{-1}$). Deixou-se em repouso por 1 ou 2 dias para dissolução completa.

ANEXO 06

Determinação da demanda bioquímica de oxigênio (DBO)

A Demanda Bioquímica de Oxigênio foi determinada através do método da incubação com medição da quantidade de oxigênio consumida durante a incubação. As amostras foram colocadas em frascos específicos para as análises de DBO completamente selados e mantidos em incubadora a $20^\circ C$ por 05 dias. O oxigênio foi medido através do Método Analítico Digital, antes e após a incubação e a diferença da concentração de oxigênio determinada, o que representa o valor de DBO.

ANEXO 07

Determinação de nitrogênio total – Método Kjeldahl

O procedimento do método baseia-se no aquecimento da amostra com ácido sulfúrico para digestão até que o carbono e o hidrogênio sejam oxidados. O nitrogênio da proteína é reduzido e transformado em sulfato de amônia. Adiciona-se NaOH concentrado e aquece-se para a liberação da amônia dentro de um volume conhecido de uma solução de ácido bórico, formando borato de amônia. Este então é dosado com uma solução ácida (HCl) padronizada.

Foram colocados em um tubo de ensaio com borda reforçada (25x250 mm) 200 mg de amostra, 1,5 g de mistura de catalisadores e 3,0 mL de H_2SO_4 concentrado. Os mesmos foram aquecidos em um bloco digestor a $150^\circ C$ por 20 minutos sendo posteriormente resfriados a temperatura ambiente, após, com agitação, foram adicionados 40 mL de água destilada. Os tubos foram transferidos para um aparelho de destilação, onde foi acrescentado excesso de hidróxido de sódio. A amônia, que em meio ácido estava sob a

forma de NH_4HSO_4 (não-volátil), em meio básico, passou para a forma de NH_3 (volátil). Foi então destilada e recolhida até 2/3 de um erlenmeyer contendo 10 mL de ácido bórico e indicadores. Por fim, titulou-se o destilado com uma solução padronizada de HCl 0,1 M. O cálculo desenvolvido é direto, sendo que o número de mols do ácido consumido é igual ao número de mols da amônia.

ANEXO 08

Determinação de biomassa através de método indireto - Espectrofotômetro

O método baseia-se em um feixe de luz focado na suspensão microbiana que é parcialmente desviado (dispersão da luz) pelas células, e a percentagem de luz não desviada (transmitância, T) é medida por recurso em um espectrofotômetro. A quantidade de luz que atravessa a suspensão celular depende da concentração de células na suspensão e do tamanho destas, do comprimento de onda e da intensidade (I_0) da luz incidente e do diâmetro do tubo (cubeta) que contém a suspensão celular. A densidade óptica (D.O.) da cultura corresponde à absorvância, que é determinada com base na expressão $D.O = \log(I_0/I)$, onde I_0 é a intensidade da luz incidente e I é a intensidade da luz transmitida através da suspensão de células. Comprimentos de onda frequentemente usados para medição da Densidade Óptica de suspensões de células de bactérias ou leveduras incluem 540, 600 ou 640 nm (IST, 2005). Neste experimento, este parâmetro foi obtido através da medição da absorvância a 600 nm das amostras diluídas, medida em espectrofotômetro (modelo UV-1800, marca Shimadzu, Japão), este comprimento utilizado foi baseado em estudos já realizados por MARANGONI (2000), SQUIO (2003), FIORESE (2004) e IENCZAK (2006).

ANEXO 09

Determinação de biomassa através de método direto em eppendorf

Método baseado em RODRIGUES (2005b) e adaptado, consistiu na determinação da massa celular seca das amostras em eppendorfs. Eppendorfs previamente identificados foram mantidos em estufa à 90°C até massa constante, P_1 . Volumes de 1 mL de amostra foram adicionadas ao eppendorf identificado e pesado, e o material foi centrifugado a 14000 rpm por 3 min em uma centrífuga de eppendorf (modelo Centrifuge 5804 R, marca Eppendorf, Grã-Bretanha). O precipitado da amostra foi lavado com 0,5 mL de água

destilada, novamente centrifugado sendo o líquido sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em 0,3 mL de n-hexano, sendo agitadas vigorosamente e novamente centrifugadas, visando retirar impurezas de natureza não celular. Após esta etapa, lavou-se mais uma vez com 0,5 mL de água e centrifugou-se. O líquido sobrenadante foi descartado e o precipitado da amostra (no eppendorf) foi colocado em estufa à 90°C até peso constante para determinação final da massa celular seca P_2 . Este procedimento foi realizado em triplicata. A diferença entre P_2-P_1 foi considerada como biomassa celular seca, realizou-se a média aritmética dos pesos.

ANEXO 10

Determinação de biomassa por método direto em membrana

Um terceiro método, baseado na metodologia citada por SQUIO (2003), também de medida direta da determinação da massa celular seca das amostras, dado por gravimetria, foi obtida a partir de um volume conhecido de cultura (1 mL), filtrado através de membranas de poliamida (poro de 0,2 μ m) pré-secas em estufa a 90°C por 24 h, resfriadas em dessecador por 10 minutos e pesadas. O filtrado retido na membrana, foi lavado duas vezes com HCl 0,01 M para remoção de íons e sais presentes na biomassa e gotas de n-hexano para remoção de óleo. Em seguida, a sua secagem foi realizada em estufa novamente a 90°C por 24 h para determinação final da massa celular seca.

ANEXO 11

Determinação de Proteína – Método de Biureto

Após centrifugação a 14000 rpm durante 3 minutos, o precipitado foi ressuspensão em 5,5 mL de água destilada e a lise celular provocada por adição de 1 mL de NaOH 20 % (p/v) (molar) e incubação em banho-maria a 100°C durante 5 min. Após resfriamento, foram adicionados 170 μ L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 25 % (p/v) (molar), agitados e deixados em repouso por 5 minutos. O sobrenadante obtido, após centrifugação a 3000 rpm / 5 min., foi analisado por espectrofotometria em um comprimento de onda de 560 nm. A concentração em g.L^{-1} foi obtida através de uma curva de calibração de proteína (g.L^{-1}) vs absorvância (560nm), utilizando albumina bovina (BSA) entre 0 e 3 g.L^{-1} como padrão, conforme ilustrado na figura A.3.

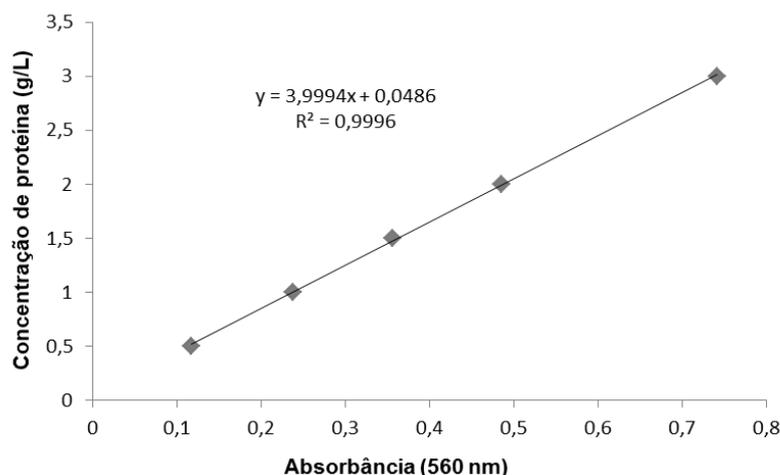


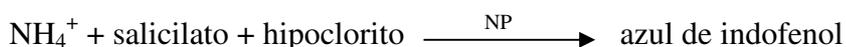
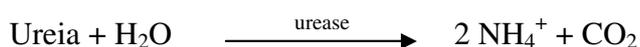
Figura A.3 - Curva de calibração de determinação da concentração de proteínas pelo método de Biureto, utilizando-se albumina bovina como padrão

ANEXO 12

Determinação de Nitrogênio - *kit* Ureia ES (Gold Analisa)

O método consiste na hidrólise da ureia em íons amônia e CO_2 através da urease. Em meio alcalino os íons amônia reagem com salicilato e hipoclorito de sódio, sob ação catalisadora do nitroprussiato de sódio, para formar indofenol (segundo esquema abaixo). A absorbância do complexo azul formado, medida em 600 nm, é diretamente proporcional à concentração de ureia na amostra analisada. Através da comparação com a concentração do padrão (70 mg.dL^{-1}), determina-se o nitrogênio amoniacal da amostra.

O fundamento do método é o seguinte:



onde: NP = nitroprussiato

Os reativos usados são os seguintes:

- Tampão: tampão fosfato 100 mmol.L^{-1} pH 6,9, salicilato de sódio 312 mmol.L^{-1} e nitroprussiato de sódio $16,8 \text{ mmol.L}^{-1}$;
- Oxidante: hidróxido de sódio $2,8 \text{ mol.L}^{-1}$ e hipoclorito de sódio 121 mmol.L^{-1} ;
- Enzima: solução de urease 268 KU.L^{-1} em tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} ;
- Padrão: solução de ureia 70 mg.dL^{-1} e azida sódica $7,7 \text{ mmol.L}^{-1}$;

- Reagente de trabalho: mistura nas proporções 1:20 (mL de enzima:mL de tampão).

O procedimento adotado para a determinação do nitrogênio amoniacal é apresentado na tabela A.1:

Tabela A.1 - Procedimento de determinação de nitrogênio amoniacal

	Branco	Padrão	Teste
Padrão	-	10 µL	-
Amostra	-	-	10 µL
Reagente de trabalho	1 mL	1 mL	1 mL

Agitar e incubar por 5 minutos a 37°C.

Oxidante	1 mL	1 mL	1 mL
----------	------	------	------

Agitar e incubar por 5 minutos a 37°C.

Ler a absorbância a 600 nm, zerando o aparelho com o branco.

O cálculo para a determinação do nitrogênio amoniacal é feito da seguinte forma (Eq. A.3):

$$[\text{NH}_4^+] = \frac{\text{absorbância teste} * 0,7 \text{ (g.L}^{-1}\text{)}}{\text{absorbância padrão}} \quad (\text{Eq A.3})$$

ANEXO 13

Determinação de P(3HB)

Um volume de 1 mL de meio de cultivo foi centrifugado a 14000 rpm / 3 min e as células foram lavadas duas vezes com água destilada sendo congeladas para serem utilizadas na metanólise. Após descongelamento, as células foram transferidas para tubos de ensaio, aos quais foram acrescentados 2 mL de clorofórmio e 2 mL de metanol acidificado (H₂SO₄ 15 %), contendo ácido benzóico 0,4 g.L⁻¹ como padrão interno.

Os tubos de ensaio foram fechados, agitados em vórtex e colocados em banho a 100°C, durante 1 h. Decorrido este tempo, os tubos de ensaio foram retirados do banho e agitados em vórtex, voltando ao banho por mais 120 min. Enfim, as amostras foram retiradas do banho e submetidas a um banho de gelo para interromper a reação. Após, adicionou-se 1 mL de água destilada, sendo a mistura agitada em vórtex por 30 segundos para formação de duas fases. A fase orgânica (inferior) (clorofórmio + P(3HB)) foi retirada

com uma pipeta Pasteur e armazenada em eppendorfs sob refrigeração para posterior análise em cromatografia gasosa (CG).

Para a elaboração da curva de P(3HB) (conforme apresentada na figura A.4), o polímero puro (P(3HB)) da Sigma foi pesado de forma a se obter massas entre 0,0014 e 0,0260 g, e submetido à metanólise conforme procedimento anterior, descrito por BRANDL *et al.* (1990).

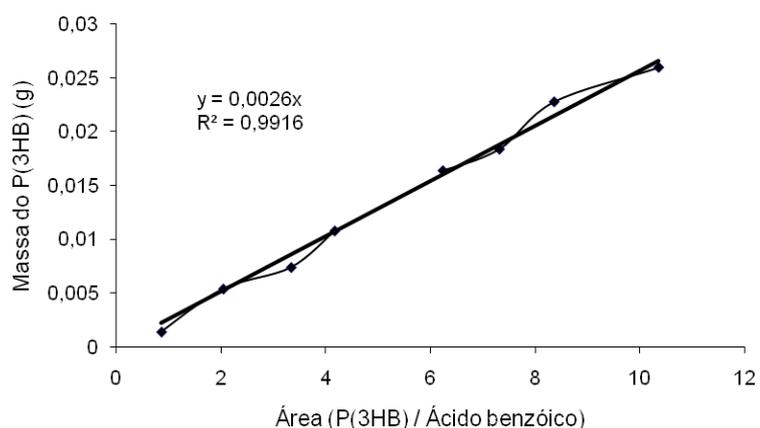


Figura A.4 - Curva típica padrão para a determinação da concentração de P(3HB)

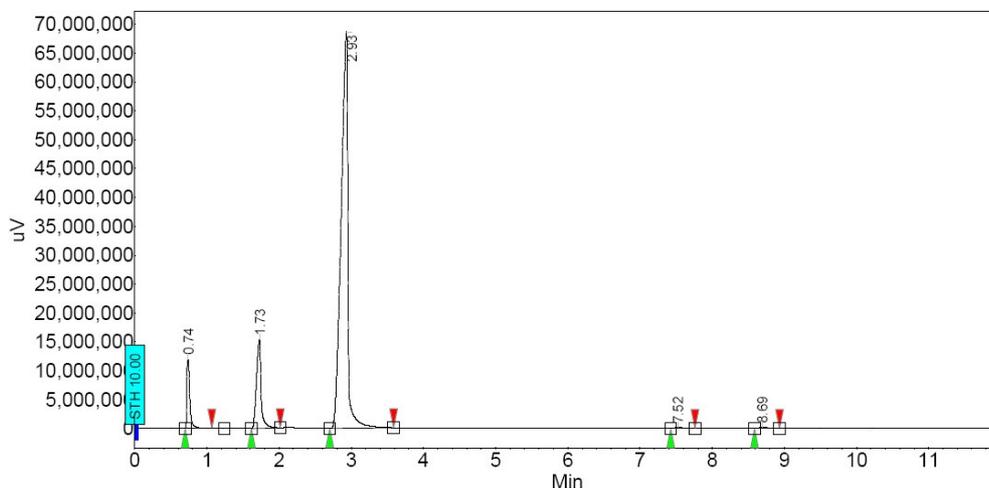


Figura A.5 - Cromatograma do ponto 01 da curva padrão

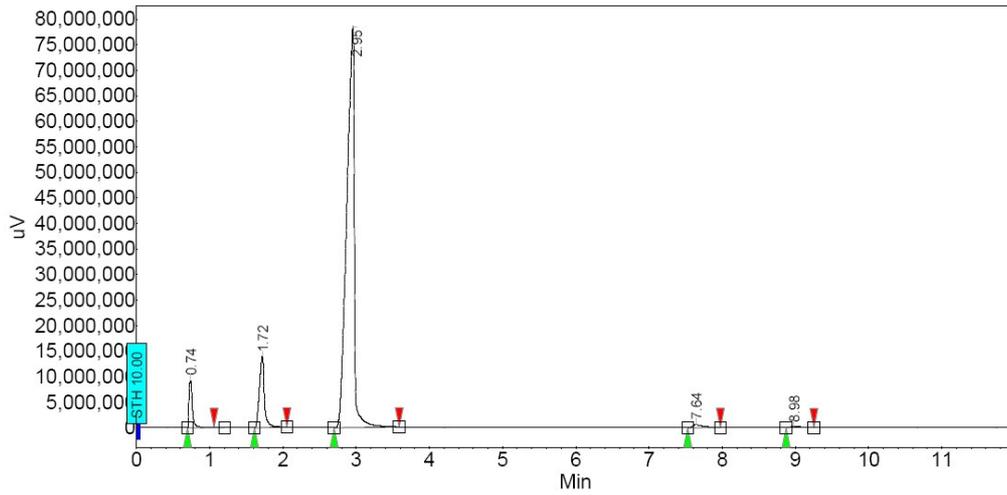


Figura A.6 - Cromatograma do ponto 02 da curva padrão

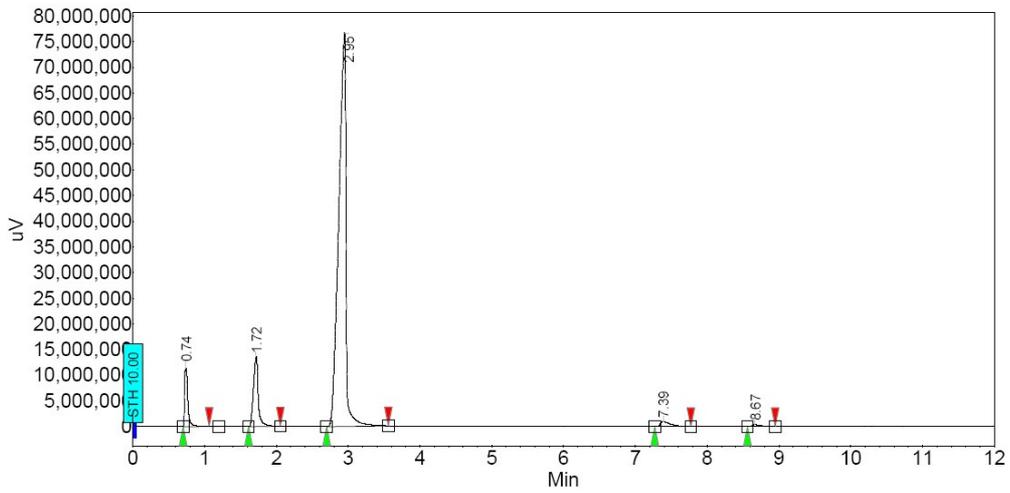


Figura A.7 - Cromatograma do ponto 03 da curva padrão

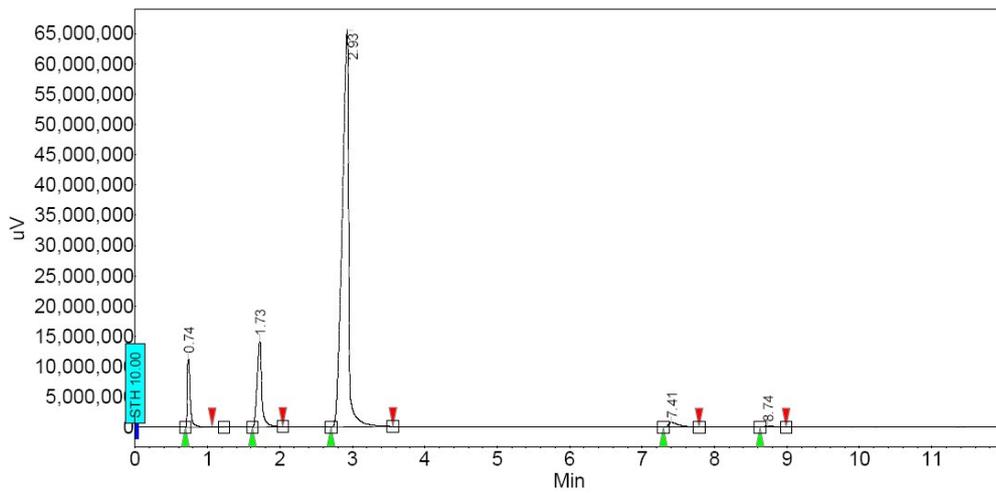


Figura A.8 - Cromatograma do ponto 04 da curva padrão

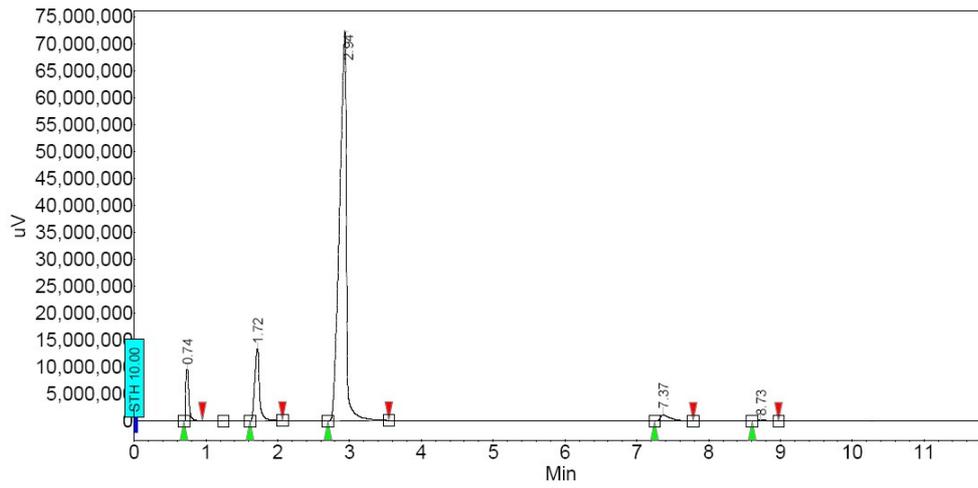


Figura A.9 - Cromatograma do ponto 05 da curva padrão

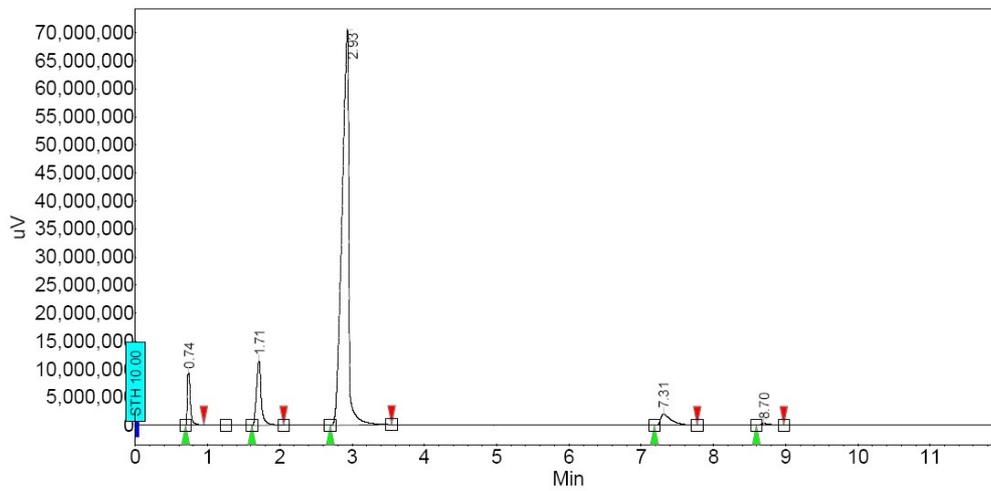


Figura A.10 - Cromatograma do ponto 06 da curva padrão

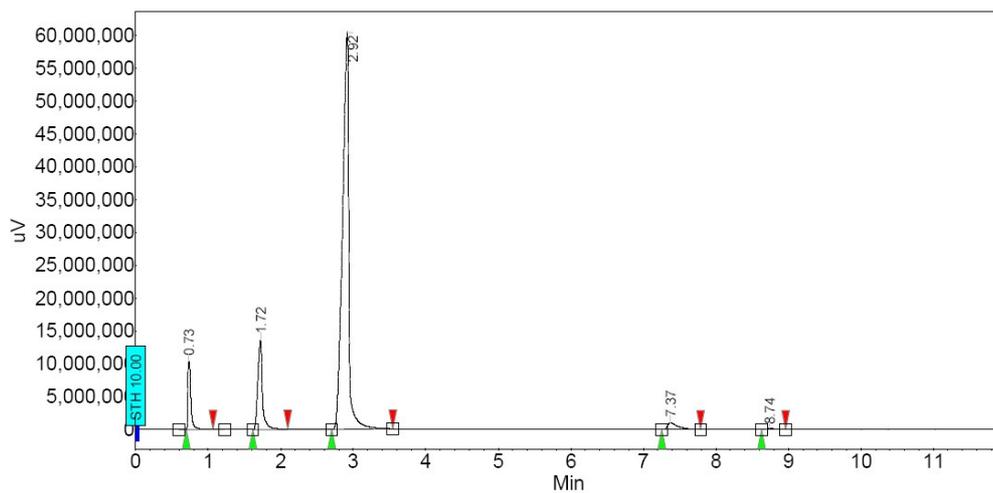


Figura A.11 - Cromatograma do ponto 07 da curva padrão

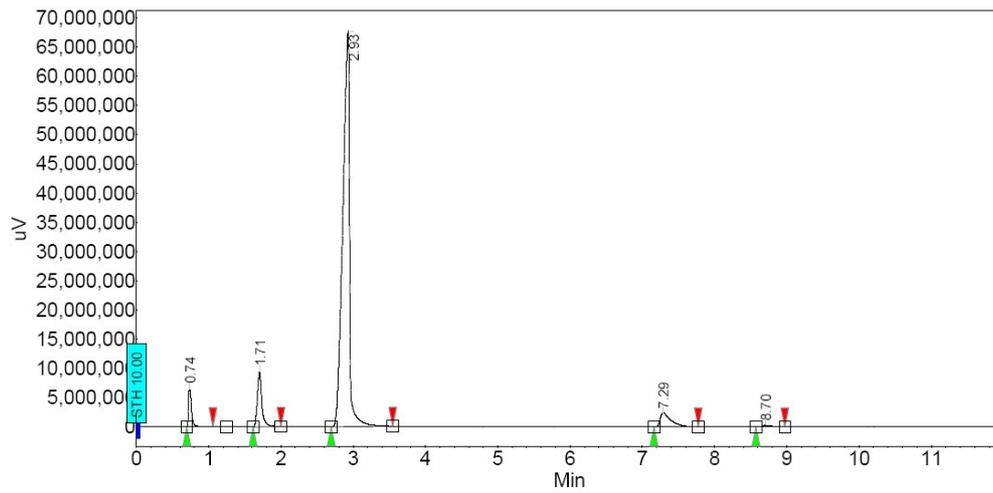


Figura A.12 - Cromatograma do ponto 08 da curva padrão

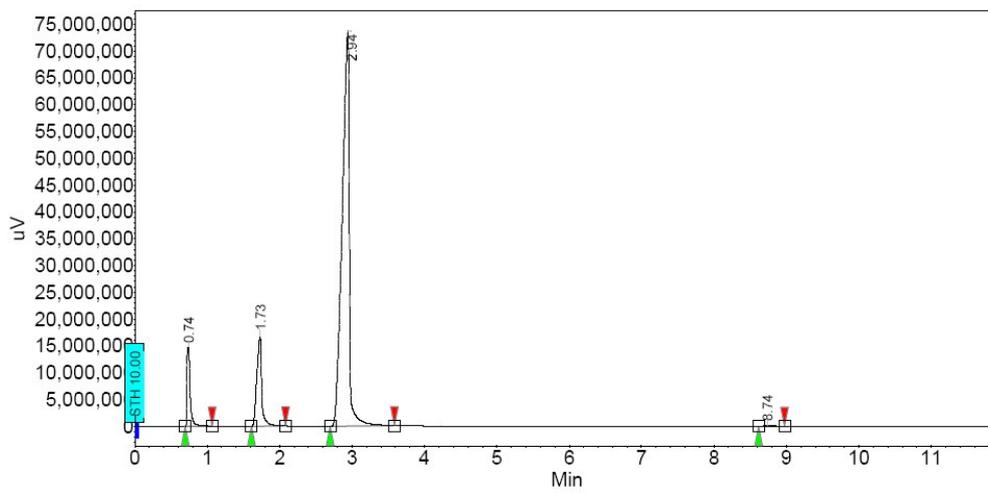


Figura A.13 - Cromatograma da amostra do ensaio A, 11 h

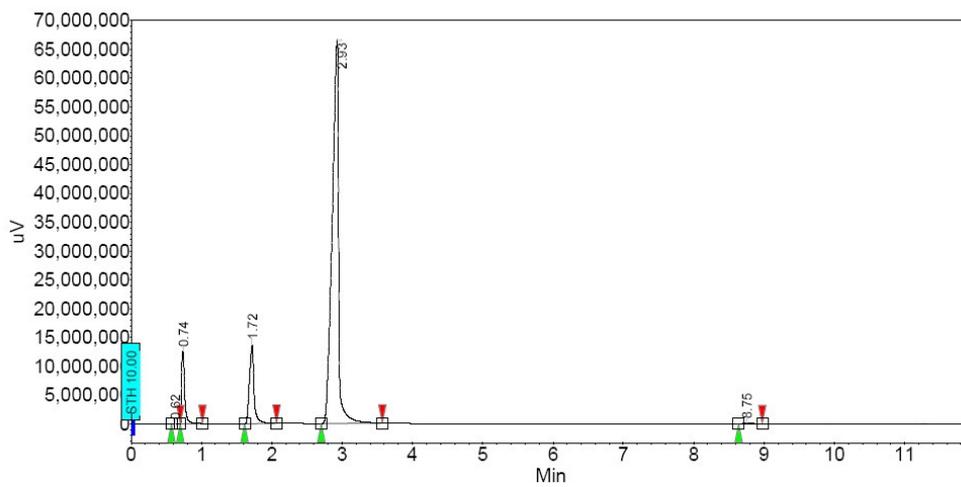


Figura A.14 - Cromatograma da amostra do ensaio A, 25 h

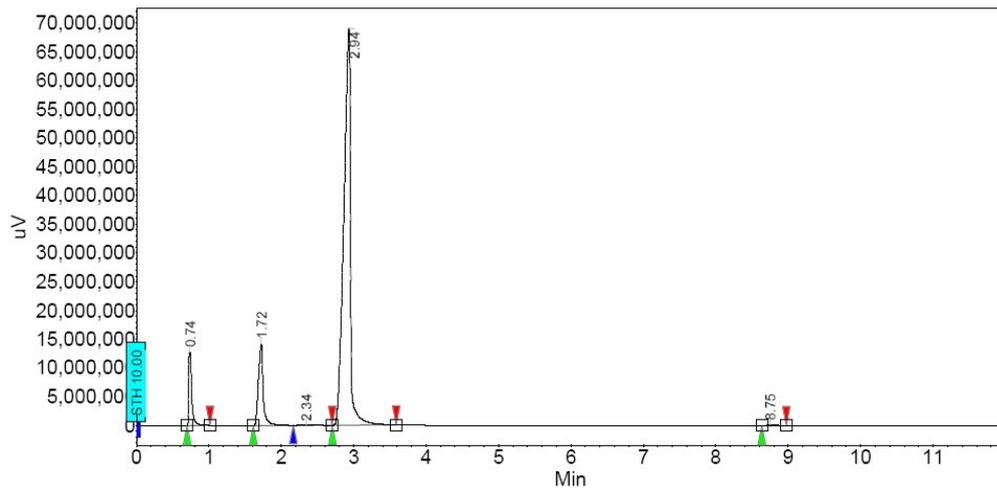


Figura A.15 - Cromatograma da amostra do ensaio A, 39 h

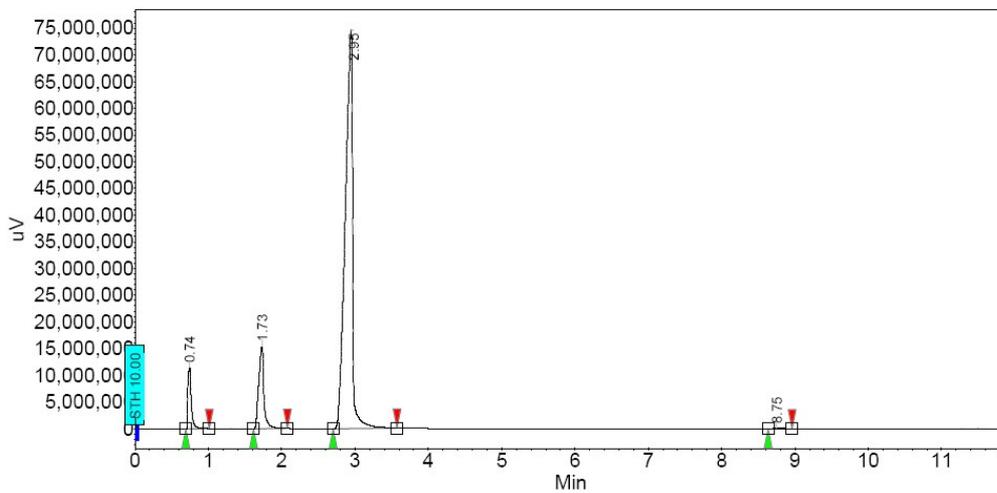


Figura A.16 - Cromatograma da amostra do ensaio A, 80 h

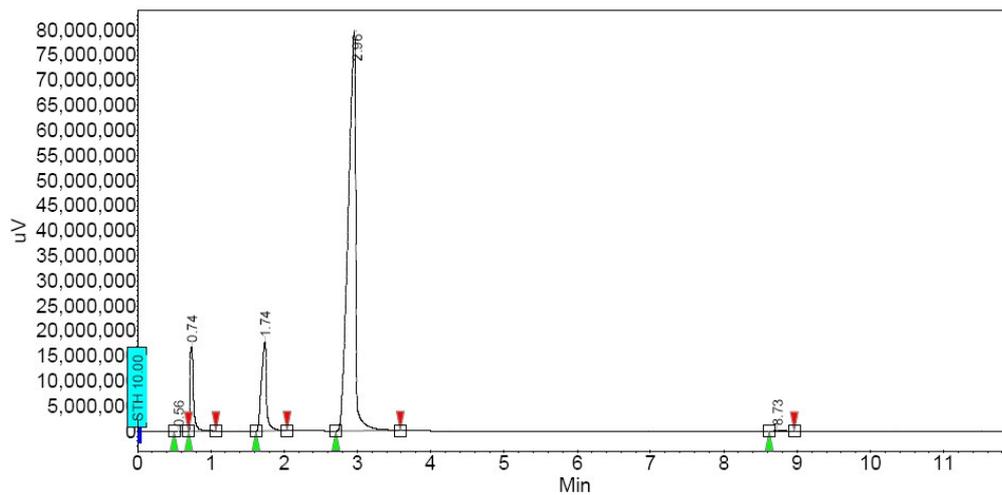


Figura A.17 - Cromatograma da amostra do ensaio B, 64 h

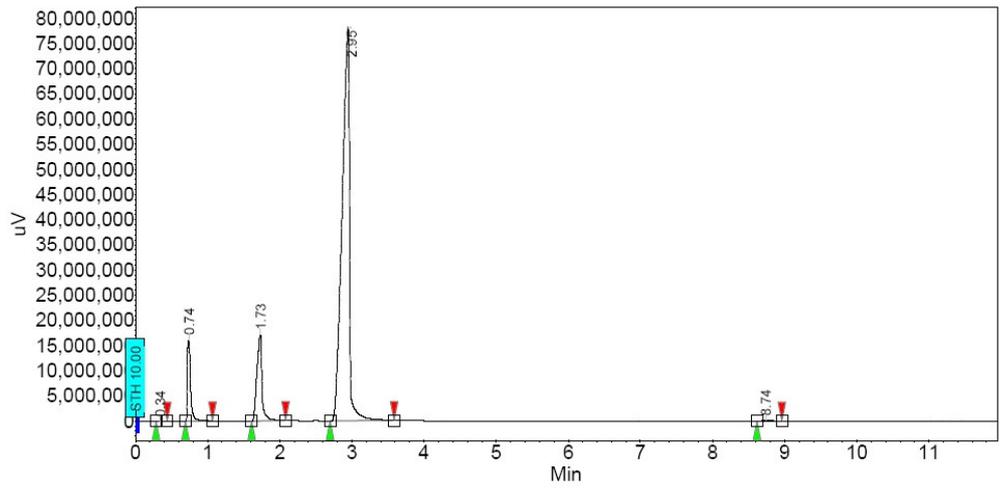


Figura A.18 - Cromatograma da amostra do ensaio B, 73 h

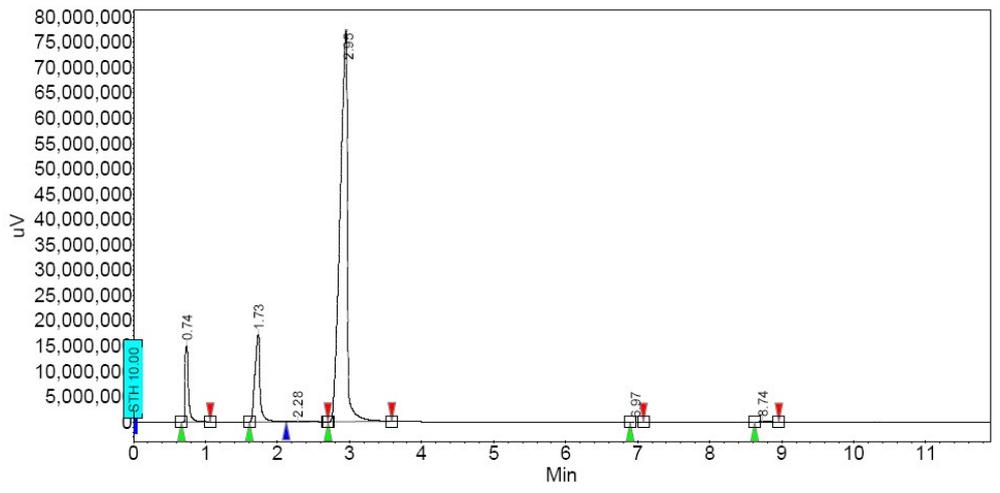


Figura A.19 - Cromatograma da amostra do ensaio B, 87 h

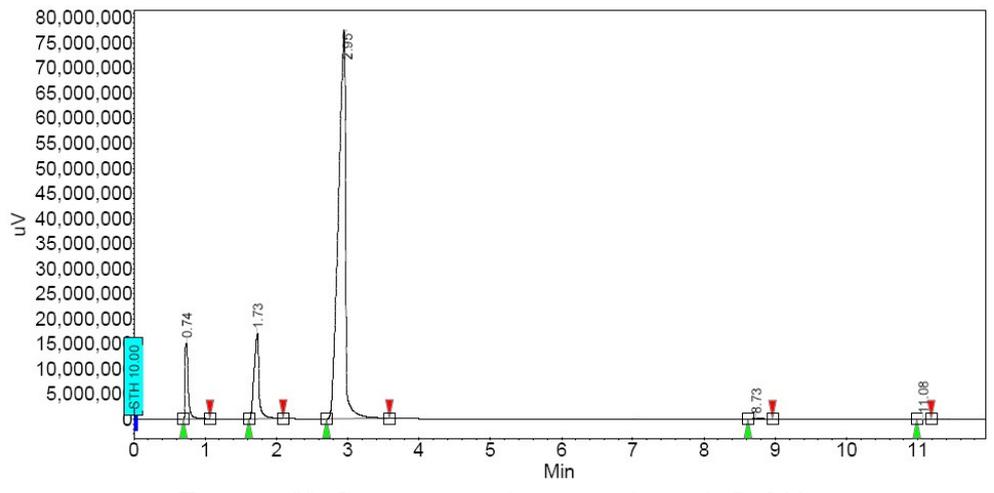


Figura A.20- Cromatograma da amostra do ensaio B, 96 h

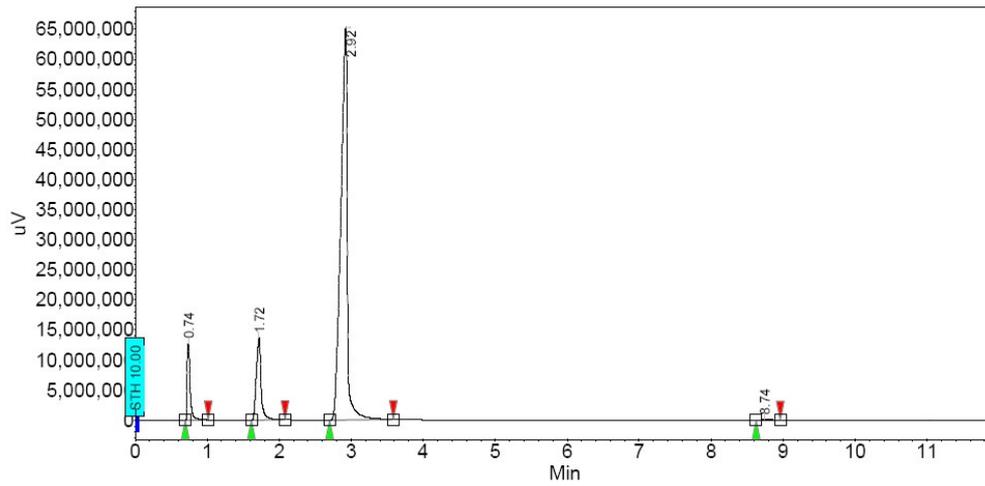


Figura A.21- Cromatograma da amostra do ensaio C, 64 h

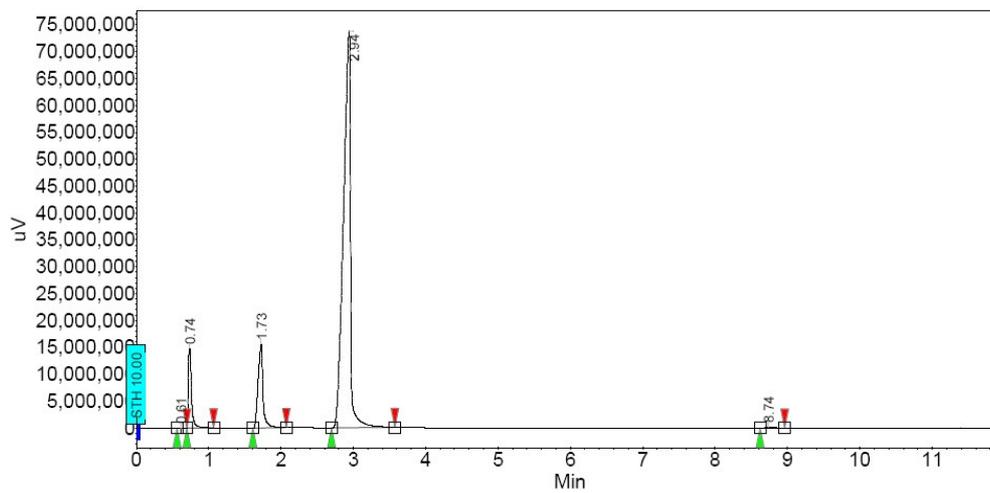


Figura A.22- Cromatograma da amostra do ensaio C, 73 h

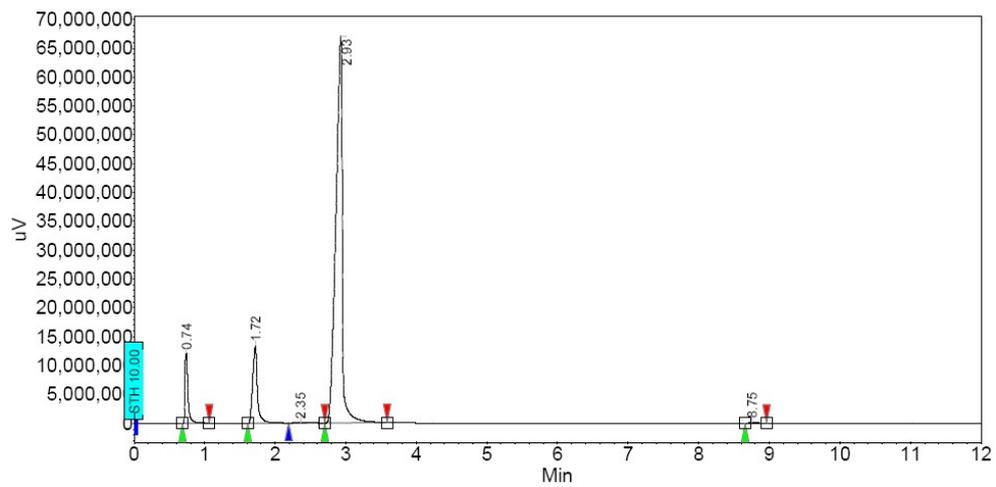


Figura A.23 - Cromatograma da amostra do ensaio C, 87 h

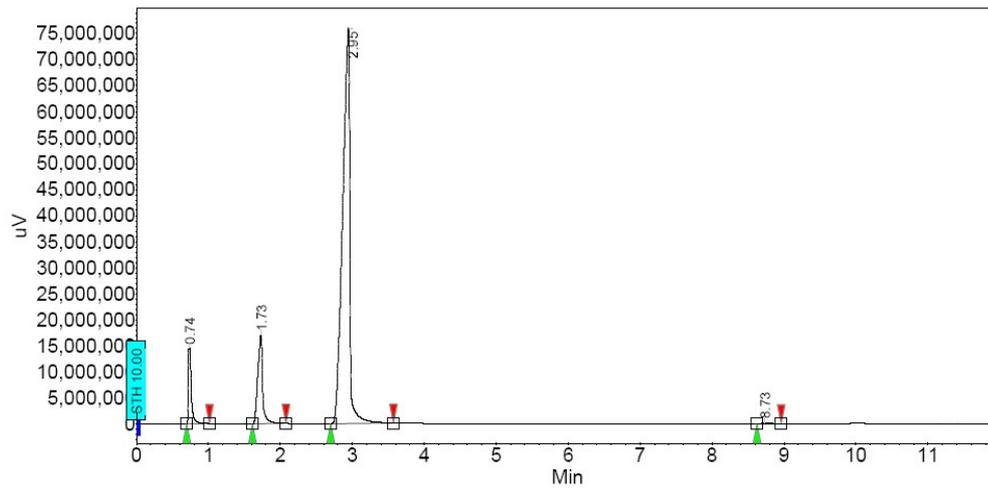


Figura A.24 - Cromatograma da amostra do ensaio C, 96 h

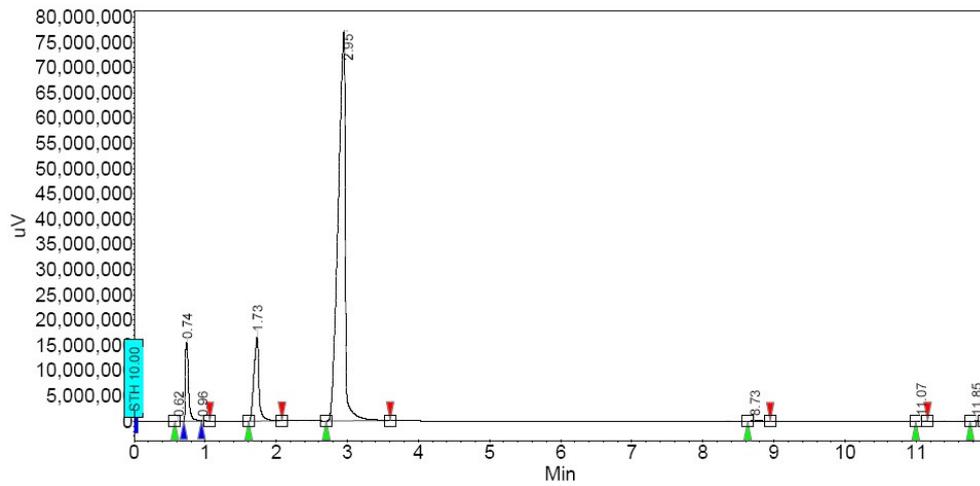


Figura A.25 - Cromatograma da amostra do ensaio D, 39 h

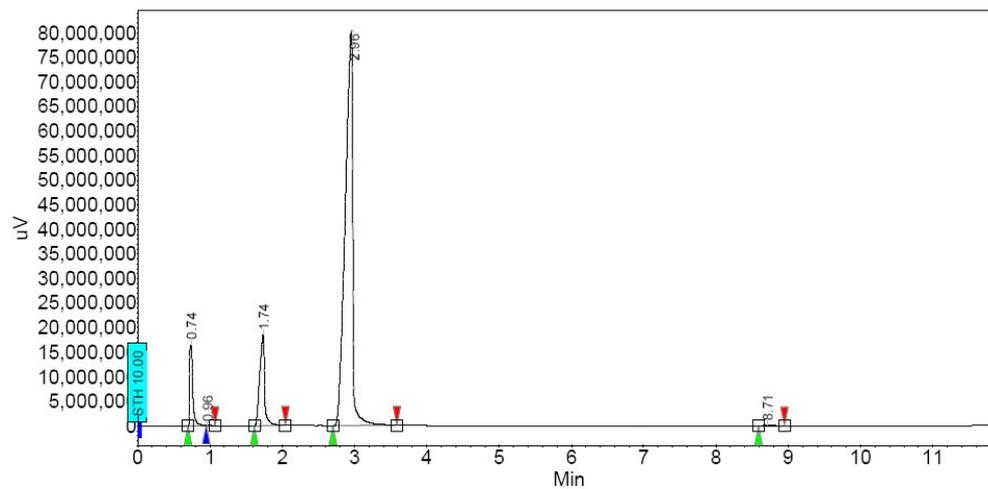


Figura A.26 - Cromatograma da amostra do ensaio D, 49 h

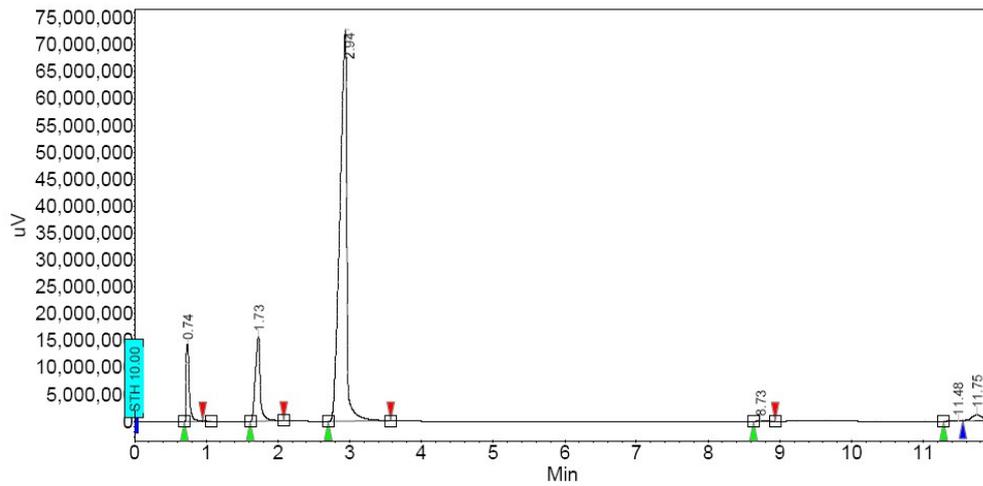


Figura A.27 - Cromatograma da amostra do ensaio D, 56 h

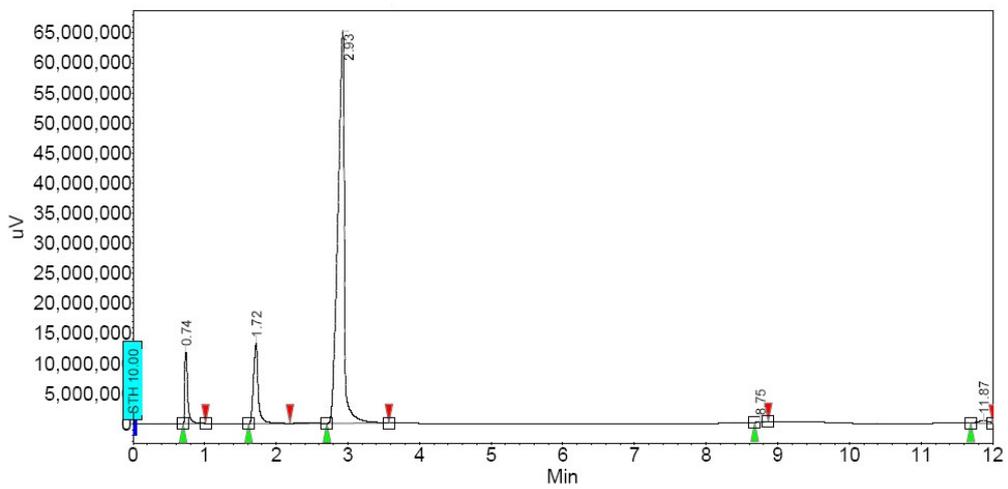


Figura A.28 - Cromatograma da amostra do ensaio D, 64 h