

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
ESCOLA DE ENGENHARIA INDUSTRIAL METALÚRGICA DE VOLTA REDONDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL

MARCELA CASSIN CHAVES

AVALIAÇÃO DA SÍNTESE DO POLI-3-HIDROXIBUTIRATO (PHB) A PARTIR DE
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E ANÁLISE DO CUSTO OPERACIONAL DE
PRODUÇÃO

Volta Redonda
2015

MARCELA CASSIN CHAVES

AVALIAÇÃO DA SÍNTESE DO POLI-3-HIDROXIBUTIRATO (PHB) A PARTIR DE
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E ANÁLISE DO CUSTO OPERACIONAL DE
PRODUÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental, da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. D.Sc. Afonso Aurélio de Carvalho Peres
Co-orientador: Prof. D.Sc. Carlos Eduardo de Souza Teodoro

Volta Redonda
2015

C512 Chaves, Marcela Cassin.

Avaliação da síntese do Poli-3-Hidroxibutirato (PHB) a partir de resíduos agroindustriais e análise do custo operacional de produção. / Marcela Cassin Chaves. – Volta Redonda, 2015.

73 f. II.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal Fluminense.

Orientador: Afonso Aurélio de Carvalho Peres.

Coorientador: Carlos Eduardo de Souza Teodoro

1. Agroindústria. 2. Bradyrhizobium japonicum. 3. Custo operacional. 4. Microorganismos. 5. PHA. 6 PHB. I. Peres, Afonso Aurélio de Carvalho. II. Teodoro, Carlos Eduardo de Souza. Título.

CDD 338.1

MARCELA CASSIN CHAVES

AVALIAÇÃO DA SÍNTESE DO POLI-3-HIDROXIBUTIRATO (PHB) A PARTIR
DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E ANÁLISE DO CUSTO OPERACIONAL DE
PRODUÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental
da Universidade Federal Fluminense,
como requisito parcial à obtenção do título
de Mestre em Tecnologia Ambiental.

Aprovada em 24 de junho de 2015.

BANCA EXAMINADORA



Profº D.Sc. Afonso Aurélio de Carvalho Peres – UFF
Orientador



Profº D.Sc. Ordovaldo Francisco Cordeiro da Silva – IFRJ



Profº D.Sc. Mendelssolm Kister de Pietre – UFF

Um pouco de ciência nos afasta de Deus.
Muito, nos aproxima.
Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar coragem, inspiração e calma para concluir esse trabalho.

Aos meus pais Edna e José Geraldo por terem sempre acreditado em mim e pelas oportunidades de estudo que me proporcionaram ao longo da vida.

Aos meus irmãos, sobrinhos e minha sogra que me deram apoio e cuidaram do João para que eu pudesse assistir às aulas, ir tantas vezes ao laboratório e escrever a dissertação.

A família e aos amigos que compreenderam tantas vezes minha ausência nos eventos.

A todos os amigos do curso, principalmente a Júlia, que me socorreu tantas vezes no momento que mais precisei, e a Vanessa pela parceria no laboratório.

Ao meu orientador Prof. D.Sc. Afonso Aurélio de Carvalho Peres pela confiança, apoio, ensinamentos e paciência em me ensinar análise de custos.

Ao meu co-orientador Prof. D.Sc. Carlos Eduardo de Souza Teodoro pelos aprendizados técnicos e pela paciência pelas inúmeras correções.

Finalmente ao meu marido Helcinho, que me incentivou a começar e continuar no curso mesmo eu estando grávida e sabendo que teria muito trabalho junto comigo. E ao João, meu filho amado, que com seu jeito calmo, amável e adaptável permitindo que eu concluísse o curso.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo produzir poli-3-hidroxibutirato (PHB) a partir de micro-organismos com uso de fontes de carbono derivadas de resíduos agroindustriais e analisar comparativamente os custos de produção envolvidos, em laboratório. O PHB é um tipo de bioplástico, que são biomateriais derivados do metabolismo de micro-organismos submetidos a crescimento em fontes de carbono. Surgem frente a um acelerado processo de consumo mundial do petróleo, que além de ser uma fonte não renovável, não é biodegradável. São necessárias pesquisas para que se consiga produzi-los com custos mais acessíveis, para que o mesmo possa concorrer no mercado com os polímeros petroquímicos não biodegradáveis. Em laboratório foi avaliada a produção de do PHB com uso de culturas bacterianas crescidas na presença sacarose, glicose e lactose e também em fontes de carbono alternativas derivadas dos resíduos agroindustriais, como o glicerol, melão e soro de leite. Na produção do PHB foram considerados os seguintes parâmetros: fonte de carbono, concentração, pH, temperatura e a produção obtida. Os custos de produção envolvidos foram determinados na condição de laboratório e os resultados analisados comparativamente. O uso de resíduos agroindustriais provenientes do processamento de matéria-prima de origem animal ou vegetal como fontes de carbono foram viáveis tecnicamente e apresentaram custos de produção atrativos para investimento, reduzindo o impacto ambiental no descarte dos resíduos agroindustriais.

Palavras-chave: agroindústria, *Bradyrhizobium japonicum*, custo operacional, micro-organismos, PHA, PHB.

ABSTRACT

This study aimed to produce poly-3-hydroxybutirate (PHB) from micro-organisms using carbon sources derived from agro-industrial residues and comparatively analyze of involved production costs in the laboratory. PHB is a type of bioplastics, which are derived from micro-organisms undergoing metabolism in growing carbon sources. Come forward at an accelerated process of global oil consumption, which besides being a non-renewable source, is not biodegradable. Research is needed so that they can produce them with more affordable, so that it can compete in the market with non-biodegradable petrochemical polymers. In laboratory evaluated the production of PHB with use of bacterial cultures grown in the presence of sucrose, glucose and lactose and also in alternative carbon sources derived from agricultural residues such as glycerol, molasses and whey. In the production of PHB the following parameters were considered: carbon source, concentration, pH, temperature and yield obtained. Production costs involved have been determined in laboratory conditions and the results analyzed comparatively. The use of organic residues from the processing of raw materials of animal or plant origin as carbon sources were technically feasible and presented attractive production costs for investment, reducing the environmental impact on disposal of agro-industrial waste.

Keywords: agribusiness, *Bradyrhizobium japonicum*, microorganisms, operational costs, PHA, PHB.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Células bacterianas contendo grânulos de polímeros da classe poli-hidroxiálcanoatos (PHA) no seu interior (fotomicrografia eletrônica).....	17
Figura 2	Principais áreas de aplicação dos biopolímeros.....	20
Figura 3	Crescimento de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (A), produção de PHB (B), e produtividade de PHB em relação ao PSC (C), quando cultivado em meio DYG's acrescido de sacarose nas concentrações de 0%, 1%, 2% e 3%.....	37
Figura 4	Crescimento de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (A), produção de PHB (B), e produtividade de PHB em relação ao PSC (C), quando cultivado em meio DYG's acrescido de glicose nas concentrações de 0%, 1%, 2% e 3%.....	39
Figura 5	Crescimento de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (A), produção de PHB (B), e produtividade de PHB em relação ao PSC (C), quando cultivado em meio DYG's acrescido de lactose nas concentrações de 0%, 1%, 2% e 3%.....	41
Figura 6	Crescimento de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (A), produção de PHB (B), e produtividade de PHB em relação ao PSC (C), quando cultivado em meio DYG's acrescido de glicerol nas concentrações de 0%, 1%, 2% e 3%.....	43
Figura 7	Crescimento de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (A), produção de PHB (B), e produtividade de PHB em relação ao PSC (C), quando cultivado em meio DYG's acrescido de melão nas concentrações de 0%, 1%, 2% e 3%.....	45
Figura 8	Crescimento de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (A), produção de PHB (B), e produtividade de PHB em relação ao PSC (C), quando cultivado em meio DYG's acrescido de soro de leite nas concentrações de 0%, 1%, 2% e 3%.....	46
Figura 9	Varição do pH, quando cultivado em meio DYG's acrescido de sacarose (A), glicose (B), lactose (C), glicerol (D), melão (E) e soro de leite (F), nas concentrações de 0%, 1%, 2% e 3%. Cultivo realizado a 30°C e 150 rpm.....	48
Figura 10	Crescimento de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (A), produção de PHB (B), variação de pH (C) e produtividade de PHB em relação ao PSC (D), quando cultivado em meio DYG's . Cultivo realizado a 30°C, 150 rpm e pH 5,0.....	53
Figura 11	Crescimento de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (A), produção de PHB (B), variação de pH (C) e produtividade de PHB em relação ao PSC (D), quando cultivado em meio DYG's . Cultivo realizado a 30°C, 150 rpm e pH 6,0.....	54
Figura 12	Crescimento de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (A), produção de PHB (B), variação de pH (C) e produtividade de PHB em relação ao PSC (D), quando cultivado em meio DYG's . Cultivo realizado a 30°C, 150 rpm e pH 7,0.....	54
Figura 13	Crescimento de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (A), produção de PHB (B), variação de pH (C) e produtividade de PHB em relação ao PSC (D), quando cultivado em meio DYG's . Cultivo realizado a 30°C, 150 rpm e pH 8,0.....	55

Figura 14	Crescimento de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (A), produção de PHB (B), variação de pH (C) e produtividade de PHB em relação ao PSC (D), quando cultivado em meio DYG's. Cultivo realizado a 25°C, 150 rpm e pH 6,0.....	57
Figura 15	Crescimento de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (A), produção de PHB (B), variação de pH (C) e produtividade de PHB em relação ao PSC (D), quando cultivado em meio DYG's. Cultivo realizado a 35°C, 150 rpm e pH 6,0.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Produção de PHB (g/L) e produtividade em relação ao PSC (%), quando cultivado em meio DYG´s acrescido de glicose 1%, sacarose 1%, lactose 2%, glicerol 2%, melação 2% e soro de leite 2%. Cultivo realizado em 48 h, a 30°C, 150 rpm e pH de 5,0; 6,0; 6,5; 7,0 e 8,0.....	51
Tabela 2	Produção de PHB (g/L) e produtividade em relação ao PSC (%), quando cultivado em meio DYG´s acrescido de glicose 1%, sacarose 1%, lactose 2%, glicerol 2%, melação 2% e soro de leite 2%. Cultivo realizado em 48 h, pH 6,0, 150 rpm e temperatura de 25°C, 30°C e 35°C.....	56
Tabela 3	Custo operacional, em reais, da produção em gramas de PHB, em laboratório.....	59
Tabela 4	Composição do custo operacional, em %, da produção em gramas de PHB, em laboratório.....	60
Tabela 5	Custo operacional, em reais, da produção em gramas de PHB em laboratório, considerando a doação da fonte de carbono proveniente do resíduo agroindustrial.....	61
Tabela 6	Composição do custo operacional, em %, da produção em gramas de PHB em laboratório, considerando a doação da fonte de carbono proveniente do resíduo agroindustrial.....	62
Tabela 7	Resultados da análise econômica comparativa do custo operacional, em reais, e a relação, em %, da produção em gramas de PHB em laboratório das fontes de carbono com a sacarose.....	63

SUMÁRIO

1	Introdução.....	13
2	Objetivos.....	15
2.1	Objetivo geral.....	15
2.2	Objetivos específicos.....	15
3	Referencial teórico.....	16
3.1	Caracterização do bioplástico.....	16
3.2	Poliésteres bacterianos: polihidroxialcanoatos (PHA).....	17
3.2.1	Polihidroxibutirato (PHB).....	18
3.2.1.1	Propriedades do PHB.....	19
3.2.1.2	Aplicações.....	19
3.2.1.3	Degradabilidade.....	19
3.3	Utilização dos bioplásticos.....	20
3.4	Fontes de carbono/ substratos.....	21
3.5	Influência do custo na produção industrial de bioplástico.....	26
3.6	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	26
3.7	Custos de produção.....	28
3.7.1	Custo fixo.....	29
3.7.2	Custo variável.....	29
3.7.3	Custo operacional.....	29
3.7.4	Custo operacional total.....	29
3.7.5	Custo total.....	30
4	Materiais e métodos.....	31
4.1	Micro-organismo utilizado nos experimentos.....	31
4.2	Manutenção do micro-organismo.....	31
4.3	Meio de cultura utilizado.....	31
4.4	Preparo do pré-inóculo e inoculação.....	31
4.5	Crescimento bacteriano.....	32
4.6	Efeito das diferentes fontes de carbono sobre o crescimento e a produção de PHB.....	32
4.7	Efeito do pH na produção de PHB.....	33
4.8	Efeito da temperatura na produção de PHB.....	33
4.9	Produção de PHB.....	33

4.10	Delineamento experimental.....	34
4.11	Análise do custo de produção.....	34
5	Resultados e discussão.....	36
5.1	Efeito das fontes de carbono na produção de PHB.....	36
5.2	Efeito do pH inicial do meio de cultura na produção de PHB.....	51
5.3	Efeito da temperatura de crescimento sobre a produção de PHB.....	55
5.4	Custo de produção de PHB.....	58
6	Conclusão.....	65
7	Referências bibliográficas.....	66

1- INTRODUÇÃO

Os plásticos na sociedade atual têm papel fundamental. São materiais versáteis de grande qualidade para aplicação em vários produtos. Nos últimos 100 anos o uso das substâncias derivadas do petróleo, seja combustível, fontes de energia ou polímeros sintéticos tem se tornado cada vez mais frequente. O uso dos plásticos principalmente vem substituindo matérias-primas convencionais, como papel, papelão, vidros e metais, em função do seu baixo custo e grande durabilidade (ROSA et al., 2002).

A maioria dos produtos utilizados no dia-a-dia é originada de matéria-prima derivada de polímeros, e ainda, os alimentos consumidos, em grande parte, são acondicionados em embalagens plásticas de fácil manuseio e praticidade. Essas embalagens e produtos vão desde garrafas de refrigerantes, passando pelas hastes flexíveis de algodão, sacos de supermercados, tubos de PVC, revestimentos de panelas e de latas de conserva, mamadeiras, tintas em geral, próteses, escovas de dente, pára-choques de veículos, tapetes, cobertores, pneus ou suportes para componentes eletrônicos, demonstrando que os polímeros sintéticos estão presentes em quase a totalidade dos utensílios de uso cotidiano (ROSA et al., 2002).

A grande problemática gerada por essa excessiva utilização de polímeros sintéticos envolve duas questões ambientais. A primeira está no fato de que esses polímeros são derivados do petróleo que vem a ser um recurso natural não renovável, com possibilidade de findar-se em pouco tempo caso a demanda de seu uso permaneça como nos dias atuais. A segunda se relaciona com o tempo de degradação desses compostos no meio ambiente. Alguns levam mais de centenas de anos para se decompor, provocando inúmeros problemas relacionados com a destinação e gerenciamento dos resíduos sólidos nos grandes centros urbanos, aumentando o impacto ambiental na natureza. Frente a esses problemas, vários estudos vêm sendo realizados, com o objetivo de se produzir polímeros que não sejam derivados do petróleo e que tenham uma degradabilidade mais rápida, proporcionando um menor impacto ambiental (BRITO et al., 2011)

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são uma classe de biopolímeros que surgem como alternativa aos polímeros petroquímicos. A diversidade de PHAs existentes possibilita uma variada gama de propriedades, podendo apresentar características que vão de termoplásticos a elastômeros e tendo, assim, potencial para a utilização em muitas aplicações.

Os bioplásticos podem ser produzidos por diversos grupos de bactérias (MADISON & HUISMAN, 1999). Para que elas produzam esses biopolímeros faz-se necessário que o

crescimento ocorra sob condições favoráveis. Para que o processo de produção do biopolímeros seja eficiente, é preciso que os micro-organismos recebam uma fonte de carbono e em alguns casos que sejam privados de algum outro nutriente. As bactérias produtoras de PHAs se dividem em dois grupos, segundo os requerimentos de seu cultivo para a síntese do polímero (LEE, KANG, CHOI, 1995).

No primeiro grupo estão as bactérias, que para sintetizar o PHA, requerem a limitação de um nutriente essencial como N, P, Mg, K, O ou S na presença de uma fonte de carbono em excesso (ASENJO et al., 1995). Desta forma elas se vêem obrigadas a armazenar dentro da célula, materiais que podem servir de reserva. Assim, produzem grânulos de polímeros que depois poderão ser extraídos dessa célula. Já as bactérias do segundo grupo, não requerem a limitação do nutriente essencial e acumulam o polímero durante a fase de crescimento, na qual existe um balanceamento de nutrientes, como é o caso de bactérias da espécie *Bradyrhizobium japonicum*, que acumulam o polímero quando entra na fase estacionária de crescimento como reserva interna de energia, para utilizar quando necessário (PAGE, 1995; LEE, 1996).

Os bioplásticos já possuem eficiência comparada aos plásticos derivados do petróleo. São biocompatíveis com tecidos vivos, o que proporciona uma vantagem na sua utilização na área da saúde. Além disso, apresentam como vantagens: a alta degradabilidade no ambiente e a conseqüente diminuição da utilização do petróleo nos meios de produção. Uma limitação ao processo de produção dos bioplásticos está no alto custo efetivo da tecnologia, sendo esta opção mais onerosa quando comparada a produção de plásticos a partir do petróleo, para o investidor (ZINN et al., 2001).

Existem diferentes abordagens propostas para se reduzir o preço praticado do bioplástico. Uma proposta é utilizar blendas, que são misturas do polímero de plástico biodegradável com materiais de baixo valor agregado, como fibras vegetais, amido, derivados de celulose dentre outros. Outras propostas seguem na direção da otimização do processo de fermentação (LEE e CHOI, 1998) ou na utilização de matérias-primas de baixo custo (KIM, 2000) e ainda na seleção e melhoramento genético de cepas (SILVA e GOMES, 1998).

Para melhorar a atratividade a esta tecnologia, é preciso que se realize uma análise comparativa dos custos de produção, não somente considerando o custo efetivo do processo de produção, mas sim os impactos e custos ambientais, bem como os benefícios gerados por esta tecnologia (KOLLER et al., 2005).

2- OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a viabilidade técnica da produção de poli-3-hidroxi-*butirato* (PHB) por *Bradyrhizobium japonicum* utilizando diferentes resíduos agroindustriais como fonte de carbono e analisar os custos de produção envolvidos no processo produtivo, em laboratório.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a produtividade de PHB através da fermentação de diferentes fontes puras de carbono: glicose, sacarose e lactose e de fontes de carbono provenientes de resíduos agroindustriais: glicerol, melão e soro de leite;

Otimizar as condições de cultivo e produção de PHB variando a concentração da fonte de carbono, a temperatura e o pH.

Analisar os custos de produção envolvidos na produção de PHB, em laboratório, com determinação do custo operacional.

Analisar a composição dos custos de produção das diferentes fontes de carbono testadas.

3- REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO BIOPLÁSTICO

Biomateriais podem ser considerados produtos químicos que podem ser sintetizados por micro-organismos, de acordo com determinadas condições ambientais.

O termo biopolímero ou bioplástico, tem sido empregado na literatura científica e relaciona os polímeros naturais e sintéticos, sendo os primeiros àqueles obtidos e utilizados *in natura*, às vezes, modificados por processos especiais ou biossintetizados, tais como as peles de animais, fibras vegetais, resinas extraídas de plantas e o látex, borracha natural, muitas vezes, designados por biopolímeros. Por outro lado, os polímeros sintéticos que têm como fonte de matéria prima os produtos naturais, durante o seu processamento, as sínteses químicas conferem-lhes propriedades físico-químicas características dos polímeros desejados (ANDRADE et al., 2001).

A ausência de padronização dos termos referenciados envolve pelo menos mais três classes de materiais designados como biopolímeros, tais como polímeros biocompatíveis, polímeros biodegradáveis e polímeros de fontes renováveis.

Materiais biocompatíveis são aqueles capazes de substituírem os órgãos de seres vivos ou, ao serem implantados em organismos vivos, são facilmente adaptados e não liberam substâncias tóxicas. Destacam-se os polímeros usados como substitutos da platina ou titânio em próteses. Materiais biodegradáveis são degradados pela ação de fungos, bactérias ou algas e produzem dióxido de carbono, biomassa e água. Por último, polímeros oriundos de fontes renováveis são aqueles fabricados a partir de insumos químicos extraídos de fontes renováveis, tais como etanol e são classificados como polímeros naturais ou sintéticos, biodegradáveis ou biocompatíveis (FRANCHETTI e MARCONATO, 2006).

Os bioplásticos são uma classe de biomateriais. São poliésteres produzidos por micro-organismos e ficam acumulados dentro das células dos mesmos. São geralmente de origem lipídica e podem ser armazenados na forma de líquidos, materiais amorfos ou grânulos. São produzidos quando a célula microbiana está crescendo sob alguma condição de estresse, como por exemplo, a ausência de um dos nutrientes essenciais (MADISON e HUISMAN, 1999).

As características físico-químicas desses biocompostos, tais como composições monoméricas, estruturas macromoleculares, tamanho dos grânulos, número e outras dependerão da sua origem microbiana (LUENGO et al., 2003).

Para serem considerados bioplásticos, estes devem apresentar características semelhantes aos plásticos convencionais de origem petroquímica. Além disso, devem ser biodegradáveis e biocompatíveis, não produzindo respostas tóxicas ou imunológicas quando aplicados em tecidos vivos (ROSSI et al., 2005).

3.2 POLIÉSTERES BACTERIANOS: POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)

Os poliésteres bacterianos - Polihidroxicanoatos (PHA) compõem uma das classes de polímeros bacterianos estudados no Brasil (FRANCHETTI e MARCONATO, 2006; SILVA et al., 2007). Estes polímeros são de grande interesse econômico e ambiental, pois são termoplásticos, biodegradáveis, biocompatíveis, podendo ser sintetizados a partir de fontes renováveis, entre elas o bagaço de cana-de-açúcar. Esses polímeros apresentam boa resistência à hidrólise química, porém grande sensibilidade ao ataque microbiano, o que limita o uso em embalagens de alimentos (FRANCHETTI e MARCONATO, 2006).

Esses polímeros são produzidos por uma ampla variedade de micro-organismos, com o objetivo de atuar como reserva intracelular de energia e carbono (SCANDOLA et al., 1997). O seu acúmulo se dá no citoplasma da célula sob forma de grânulos (figura 1) e sua função se assemelha ao glicogênio sintetizado e estocado pelos mamíferos (BARHAM et al., 1984).

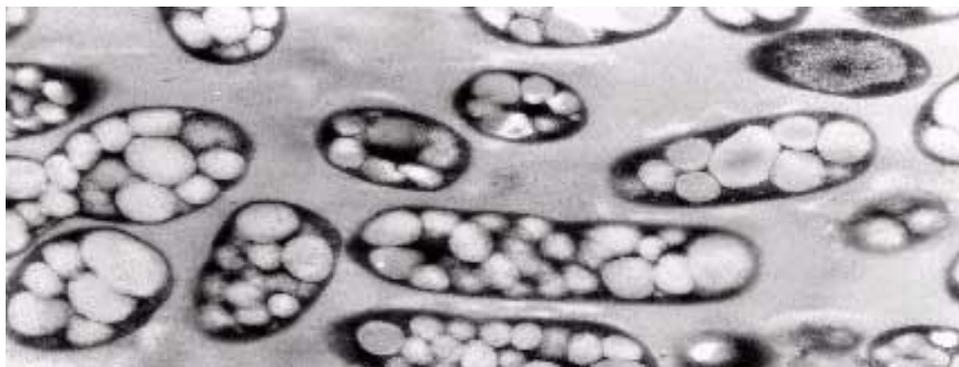


Figura 1. Células bacterianas contendo grânulos de polímeros da classe poli-hidroxicanoatos (PHA) no seu interior (fotomicrografia eletrônica).
Fonte: Silva et al. (2007)

3.2.1 Polihidroxibutirato (PHB)

Dentre a família dos PHA, o polihidroxibutirato (PHB), merece destaque por ser o único entre os PHA disponíveis comercialmente (BRAUNEGG et al., 1998).

O PHB foi descoberto por Lemoigne em 1925 (IRIONDO et al., 1996), mas não despertou interesse por parte dos pesquisadores e empresas até a década de 70, quando a crise do mercado petrolífero impulsionou a busca por polímeros alternativos. Tornou-se necessário descobrir uma alternativa também para substituir os materiais plásticos produzidos a partir do petróleo (ZINN et al., 2001).

Nesse mesmo cenário o Brasil implementou um programa voltado para o uso de etanol como combustível para motor de veículos. Este programa levou ao aumento da produção nas usinas de açúcar e álcool, o que fez com que a agroindústria brasileira apresentasse características importantes para a integração da produção do polihidroxibutirato com as usinas de cana-de-açúcar (NONATO et al., 2001).

O PHB é relativamente abundante no meio ambiente e pode ser encontrado em bactérias do solo, em algas verdes e azul e esgoto microbiologicamente tratados (BARHAM et al., 1984). Entre as espécies de relevância comercial e científica na síntese e estoque de PHB, pode-se citar a *Cupriavidus necator*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Pseudomonas oleovans*, *Alcaligenes eutrophus* e *Bacillus megaterium* (STEINBUCHER, 1991; AYORINDE et al., 1998; LUENGO et al., 2003;).

A quantidade em porcentagem de PHB nas células é normalmente baixa, entre 1 e 30%, mas sob condições de fermentação controlada com aumento na proporção de carbono e redução de nitrogênio, magnésio, sulfato ou oxigênio, o produto polimérico pode aumentar para 70%, relativamente a massa seca (BARHAM et al., 1984). Assim, pode-se concluir que o micro-organismo sintetiza o PHB em situações de limitação de nutrientes que não sejam o carbono, e é assim que ocorre a produção industrial desse material (SUDESH et al., 2000). Em todos os casos os polímeros apresentam-se discretamente como grânulos nos micro-organismos e podem ser extraídos utilizando-se certa variedade de solventes como: clorofórmio, dicloroetileno, cloreto de metileno e piridina (BARHAM et al., 1984).

3.2.1.1 Propriedades do PHB

O PHB é um poliéster semicristalino de cadeia linear, termoplástico e opticamente ativo (BARHAM et al., 1984). O PHB obtido microbiologicamente pode ter sua massa molar variando amplamente, de 10.000 a 3.000.000 g/mol, dependendo do micro-organismo, da fonte de carbono e das condições de purificação do polímero. Apresenta alta cristalinidade, variando entre 55 e 80%. A análise microscópica indica uma cinética de cristalização com taxas baixas, o que significa que forma poucos, porém grandes cristais. Esta característica ocasiona um material quebradiço, com baixa taxa de degradação em relação a outros polímeros biodegradáveis, o que pode impor limitações em suas aplicações (SUDESH e DOI, 2000).

3.2.1.2 Aplicações

O fato de o PHB ser um polímero biocompatível e biodegradável faz com que haja grande interesse em buscar aplicações para este material. Como exemplos, podem ser citadas algumas aplicações em embalagens, formação de filmes biodegradáveis, implante de ossos, microcápsulas de compostos hidrossolúveis, canais para reconstituição de nervos, sistemas parenterais de liberação de drogas (BARHAM et al., 1984). Em relação à biocompatibilidade, ela acontece devido à grande quantidade de PHB de baixa massa molar na corrente sanguínea humana, além disso, o produto resultante da degradação do PHB é o ácido-3-hidroxitútrico, um metabólito comum nos seres vivos em geral (DOYLE e PEARSON, 1996).

3.2.1.3 Degradabilidade

O PHB apresenta um tempo de degradação de aproximadamente 60 dias, se depositado em locais adequados, como os chamados ambientes microbiologicamente ativos (solos, cursos d'água saudáveis, aterros sanitários, lodos ativados, biodigestores, e usinas de compostagem), o que é uma vantagem em relação aos plásticos convencionais, que podem levar centenas de anos para se degradarem. A expectativa gerada no mercado é que se substitua, em médio prazo, de 2 a 3% dos plásticos convencionais, cuja produção é de cerca de 100 milhões de t/ano, pelo bioplástico (PACHEKOSKI et al., 2000).

Diversos micro-organismos como fungos e bactérias podem degradar o PHB, sendo que quase 300 tipos de bactérias já foram identificados. A taxa de degradação depende de fatores ambientais como temperatura, umidade, pH, composição química, cristalinidade, presença de aditivos e da área superficial deste polímero (SCANDOLA et al., 1997). Essa excelente característica de biodegradação indica que o PHB pode competir com vários polímeros sintéticos na indústria de embalagens, especialmente nas áreas onde há comprometimento com o meio ambiente (AVELLA e MARTUSCELLI, 1988).

3.3 UTILIZAÇÃO DOS BIOPLÁSTICOS

Os bioplásticos atendem aos requisitos de aplicação em áreas específicas de mercado (Figura 2), pois muitas empresas reconhecem que ter um produto feito com plástico biodegradável é um diferencial importante. Podem oferecer uma grande variedade de propriedades, desde plásticos rígidos altamente cristalinos a polímeros dúcteis. São utilizados na fabricação de sacolas plásticas descartáveis, embalagens para alimentos, produtos de limpeza, higiene, cosméticos e produtos farmacêuticos. Também servem para produzir sacos e vasilhames para fertilizantes e defensivos agrícolas, vasos para mudas e produtos injetáveis.

Além disso, por serem biocompatíveis e facilmente absorvidos pelo organismo humano, podem ser empregados na área médico-farmacêutica, prestando-se à fabricação de fios de sutura, próteses ósseas e cápsulas, que liberam gradualmente medicamentos na corrente sanguínea, dentre outros (ROSA et al., 2002; BORSCHIVIER et al., 2008; PITT et al., 2011).

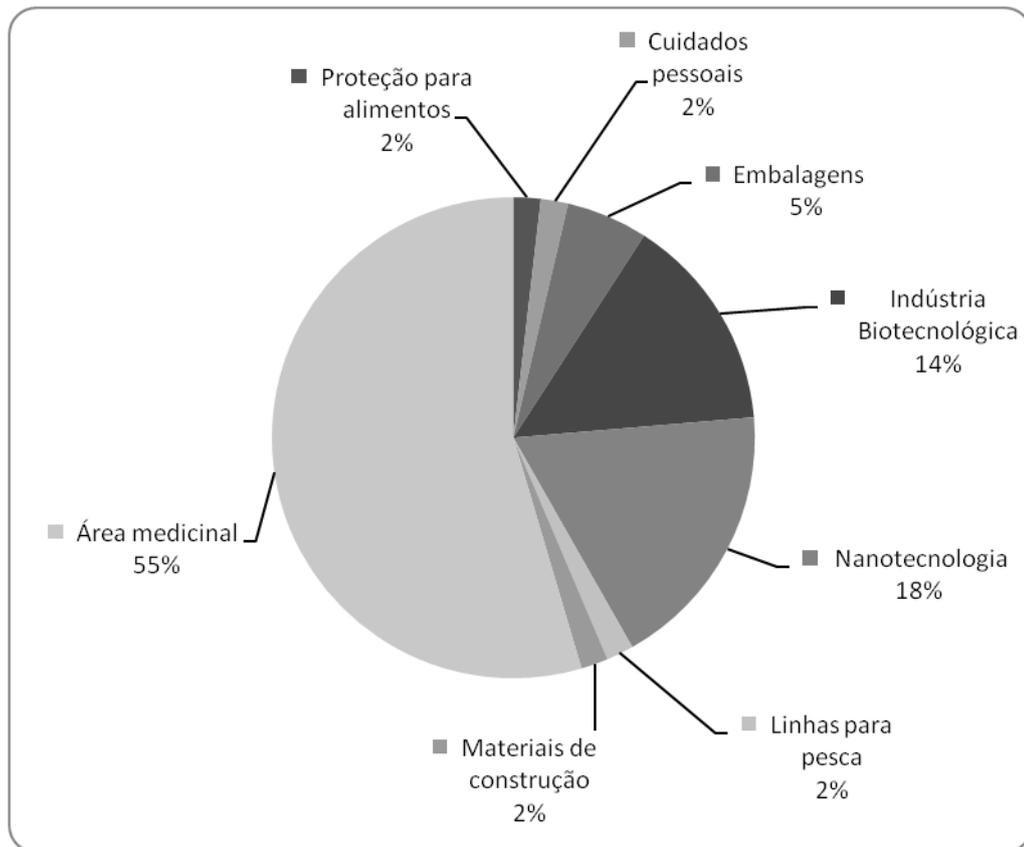


Figura 2. Principais áreas de aplicação dos biopolímeros.
Fonte: BORSCHIVIER et al. (2008).

É importante ressaltar que a produção dos bioplásticos aparece num cenário de alto consumo de polímeros derivados do petróleo. A vantagem da utilização dos biopolímeros em relação aos polímeros convencionais se deve ao fato desses últimos serem de difícil degradação no ambiente e por serem derivados de fontes não renováveis. Sendo assim, o bioplástico pode ter sucesso no mercado, desde que as empresas consigam reduzir seus custos, melhorem sua produção e suas fontes de matéria prima, e principalmente, garantam aos clientes que seus produtos sejam realmente produzidos de maneira sustentável (ILES & MARTIN, 2013).

3.4 FONTES DE CARBONO/SUBSTRATOS

Existem diversas técnicas indicadas para a produção de bioplástico microbiano. De uma maneira geral os bioplásticos microbianos são produzidos por alguns grupos de bactérias que recebem diferentes fontes de carbono e ao mesmo tempo são privados de alguma outra

fonte de nutriente, como o nitrogênio ou fósforo, por exemplo. Assim esses grupos acabam produzindo os grânulos de algum polímero que fica armazenado dentro de suas células.

Na indústria química, segundo Willke e Vorlop (2004), as fontes bioenergéticas mais importantes são óleo vegetal, glicerol, amido, celulose, açúcar de beterraba e cana-de-açúcar (sacarose), madeiras (ligno-celulose, celulose) e resíduos agroindustriais (biomassa, gorduras, óleos, soro de leite, glicerol, entre outros).

Existem mais de 90 gêneros de micro-organismos, incluindo aeróbios, anaeróbios, fotossintéticos, arqueobactérias capazes de acumular biopolímeros. Dentre estes gêneros ressaltam-se as seguintes espécies: *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus megaterium*, *Cupriavidus necator*, *Bradyrhizobium japonicum* entre outras (STEINBUCHER, 1991; AYORINDE et al., 1998; LUENGO et al., 2003).

O custo de produção de plásticos derivados do petróleo apresenta um valor menor que US\$ 1.00/kg, valor este inferior aquele encontrado para a produção de PHAs (US\$ 4.00 a US\$ 5.00/kg) (LEE et al., 1999; SHEN et al., 2009). Segundo Shen et al. (2009), um dos problemas que freia a aplicação comercial do PHB é justamente o alto valor do custo de produção, associado ao custo do substrato, principalmente a fonte de carbono.

Para a produção de PHB atingir viabilidade comercial, bem como para melhorar seu perfil de sustentabilidade, sua produção deve ser proveniente de fontes renováveis baratas. Possibilidades incluem carboidratos (melaço de cana e beterraba, hidrolisados de amido – milho e mandioca, lactose proveniente do soro de leite, hidrolisados de celulose e hemicelulose – resíduos da indústria de papel); alcoóis (resíduos provenientes da produção de biodiesel – metanol mais glicerol, metanol); óleos e gorduras (lipídeos provenientes de resíduos de animais e plantas); ácidos orgânicos (ácido lático proveniente da indústria de laticínios) (LEE et al., 1995; REHM, 2003; SHEN et al., 2009).

Desta forma, o custo de produção de PHA pode ser fortemente reduzido através do uso destes substratos baratos, como os resíduos agroindustriais. Estes custos podem ser reduzidos para valores entre US\$ 1.00 e US\$ 2.00/kg de PHA (LEE et al., 1999; TSUGE, 2002; WILLKE e VORLOP, 2004).

Industrialmente os bioplásticos têm sido produzidos a partir de sacarose. As propriedades mais realçadas no plástico utilizando a sacarose da cana de açúcar como fonte de carbono é a sua completa biodegradabilidade (não poluidora) além de sua capacidade de ser produzido por processos que usam tecnologia limpa. Este plástico é um produto

biocompatível e ecologicamente correto. Sua produção é feita por meio da fermentação por micro-organismos, do açúcar da cana de açúcar que inicialmente é invertido por um processo enzimático transformando-se em um xarope (FILHO, 2003).

No processo também se utiliza um álcool superior como solvente, que é empregado como extrator do biopolímero. No seu processo de produção, o bagaço da cana de açúcar é usado como fonte para a produção de energia elétrica e vapor. Os efluentes são basicamente água e matéria orgânica da bactéria que por sua vez é lançada na lavoura de cana de açúcar, como fertilizante orgânico (FILHO, 2003).

Uma alternativa na tentativa de baixar os custos de produção é a utilização da lactose presente no soro do leite. Os efluentes líquidos são considerados um dos principais responsáveis pela poluição causada pela indústria de laticínios. Em muitos laticínios o soro é descartado junto com os demais efluentes, sendo considerado um forte agravante devido ao seu elevado potencial poluidor. O soro é aproximadamente cem vezes mais poluente que o esgoto doméstico. Devem ser captados e conduzidos separadamente, de modo a viabilizar o seu reaproveitamento. Atualmente constitui prática incorreta descartar o soro, direta e indiretamente, nos cursos de água. Uma fábrica com produção média de 300.000 litros de soro por dia polui o equivalente a uma cidade com 150.000 habitantes (SILVA, 2011).

Uma das formas de evitar a geração desses passivos ambientais é tratar tais resíduos, fazer o controle dos processos e buscar alternativas de reuso dos materiais. Essa última opção pode reduzir custos com tratamento e disposição final e garantir que a empresa esteja em consonância com a legislação ambiental. O soro de leite, resultante da fabricação de queijos, vem sendo estudado como substrato para a produção de PHA por bactérias (KOLLER et al., 2005). A produção diária de soro de leite atinge quantidades muito elevadas (130-145 milhões de toneladas no mundo, anualmente) e seu descarte representa um sério problema ambiental (THORNE et al., 1988; SOLAIMAN, et al., 2006). Porém, contém alto teor de lactose, proteínas e sais minerais, constituindo um meio de cultura rico e de fácil obtenção (ATHANASIADIS et al., 2002). Vários micro-organismos têm sido estudados utilizando-se soro de leite como substrato para a produção de PHAs (SOLAIMAN, et al., 2006).

Alguns autores já relataram a capacidade de produção de PHAs a partir de soro *in natura* ou hidrolizado (KIM, 2000; MARANGONI et al., 2002.; NIKEL et al., 2006; KOLLER et al., 2008; BOSCO e CHIAMPO, 2010; POVOLO et al., 2010). *E. coli*, por exemplo, é capaz de consumir lactose presente no soro de queijo como fonte de carbono para

produção de PHAs (WONG e LEE, 1998; AHN et al., 2000; PARK et al., 2002; NIKEL et al., 2006).

Bosco e Chiampo (2010) em seus estudos utilizando soro de queijo, como substrato e lodo ativado como inóculo, obteve um acúmulo de PHA de 6,44 %, quando pH foi mantido igual a 7,0 e de 8,67 % sem o ajuste do pH inicial do meio de cultivo. Dentre os isolados de *E. coli*, contendo o plasmídeo pRLC2 (PHA sintase de *C. violaceum*), o que apresentou o maior acúmulo de PHB foi também JM101, cujos valores de MCS e acúmulo PHB foram de 3,01 g/L de PSC, 0,23 g/L de PHB e 7,8 % de rendimento.

Cesca (2011) obteve PSC 2,34g/L, PHB 0,73 com rendimento de 31,34% utilizando soro de leite testado em *E. coli*, com 24 h de cultivo e pH inicial em torno de 7,0.

Os óleos vegetais e seus derivados são boas fontes de carbono para a produção de PHA devido ao fato de ser uma fonte renovável de baixo custo. A produção anual de triacilgliceróis na agricultura está estimada em 100 milhões de toneladas (SOLAIMAN et al., 2006) e o Brasil é um dos grandes produtores mundiais, com o óleo de soja representando uma grande parcela desta produção.

Estima-se que a produção de PHA a partir de ácidos graxos é maior que a encontrada para glicose (YAMANE, 1993). Porém, a fermentação de óleos vegetais apresenta uma série de problemas como a baixa taxa de crescimento de bactérias produtoras de PHA (TSUGE, 2002). Por outro lado, do ponto de vista metabólico, os ácidos graxos são substratos energeticamente vantajosos, pois sua oxidação produz mais moléculas de ATP que a oxidação completa da glicose completamente degradada. Além disso, a hidrólise dos triacilgliceróis por micro-organismos gera glicerol que por si só serve como fonte de carbono e energia para a fermentação microbiana (SOLAIMAN et al., 2006).

O glicerol é outro resíduo que tem se mostrado atrativo. É um subproduto proveniente da produção de biodiesel. Atualmente, o glicerol produzido é utilizado em diversas indústrias como a farmacêutica, de cosméticos entre outras (KOLLER et al., 2005). Todavia, com o estímulo do governo brasileiro para a produção de biodiesel, o glicerol excedente pode ser utilizado como fonte de carbono para a produção de PHA por micro-organismos. Esse excedente pode gerar queda no seu preço de venda. A porcentagem mais elevada para o custo global de PHB é o substrato, em torno de 45%. Entretanto, se o glicerol é utilizado como matéria-prima esta porcentagem é inferior a 8% (POSADA et. al., 2011).

Mainka (2013) e Posada et al. (2011) possuem estudos demonstrando alta capacidade da produção de PHB e de produtividade de PHB em relação ao PSC quando utilizando

glicerol como fonte de carbono para micro-organismos. Os resultados em termos de produtividade ficaram entre 37% a 53% de rendimento.

Os resíduos da indústria sucroalcooleira, como bagaços, vinhaça e melão (além da sacarose e o álcool) representam também uma fonte alternativa de carbono para a produção de PHAs por micro-organismos (TAGUCHI et al., 2003). O Brasil apresenta ampla vantagem neste caso, pois, já possui uma indústria sucroalcooleira bem desenvolvida com alta produtividade.

Estudos de produção de PHB em batelada com a bactéria *E. coli* recombinante, utilizando melão como fonte de carbono, foram realizados por Liu et al. (1998). Os resultados alcançados foram de 39,5 g/L de peso seco celular, 80% de PHB com produtividade de 1 g/L h. A concentração do melão foi aumentada de 26,5 g/L para 144,0 g/L. Os autores relataram que a concentração de melão teve efeito significativo na síntese de PHB e no crescimento das células, verificando que a biomassa residual foi inibida pela alta concentração de melão, enquanto o conteúdo de polímero aumentou até o final da cultura, ou seja, altas concentrações de melão resultaram em altos conteúdos de PHB.

Abe (2010) pesquisou a produção de PHB utilizando o melão como fonte de carbono em culturas mistas, e obteve como resultado a produção de 0,5 g/L.

Resíduos agroflorestais também podem servir como fonte de carbono para a produção de PHAs. O carboidrato xilose é um componente significativo da hemicelulose de resíduos de culturas e florestas, e tem sido estudado extensivamente para a produção de álcool combustível. Porém, pesquisas com aquele açúcar como fonte de carbono para a produção de PHAs ainda são muito restritas. Todavia, bactérias que utilizam este açúcar podem ser utilizadas para a síntese de PHB a partir de xilose ou hidrolisado de hemicelulose (LEE et al., 1999).

Poucos produtos, com base em PHAs, já estão à venda comercialmente e são bem conhecidos da indústria. Mesmo contando com estes produtos, os biopolímeros não mostraram ainda uma aplicação em produtos de uso freqüente (HÄNGII, 1995). Uma das causas é o alto custo de produção deste biopolímeros (ANDERSON e DAWES, 1990; TSUGE, 2002; LENZ e MARCHESSAULT, 2005). O uso de resíduos agroindustriais e fontes de carbono de baixo custo podem contribuir para a redução nos custos de produção dos PHBs para que os biopolímeros venham se tornar um produto importante para a indústria e possam vir a substituir os plásticos produzidos a partir do petróleo (HÄNGII, 1995; TSUGE, 2002; WILLKE e VORLOP, 2004).

Desta forma, devido ao seu baixo custo e grande quantidade, os resíduos da agroindústria apresentam-se como uma alternativa barata para os processos biotecnológicos, agregando assim valor a um produto que certamente seria descartado.

3.5 INFLUÊNCIA DO CUSTO NA PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE BIOPLÁSTICOS

Existem três limitações importantes na produção de grandes quantidades de bioplásticos: em primeiro lugar, as condições especiais de crescimento necessárias para a síntese destes compostos (geralmente desequilibrado pelas condições de nutrientes que causam crescimento lento); em segundo lugar, a dificuldade envolvida na síntese de seus precursores de baixo custo, e terceiro, o alto custo de sua recuperação. Pesquisas que utilizam fontes de carbono de baixo custo são promissoras na descoberta de alternativas para uma produção viável de bioplásticos (TSUGE, 2002; WILLKE e VORLOP, 2004).

Os custos de produção para o polihidroxitirato em 1999, oscilaram entre US\$ 15.00 e US\$ 30.00 kg⁻¹ (ZINN et al., 2001) sendo superior ao custo dos plásticos sintéticos, como o propileno e o polietileno que variaram entre US\$ 0.25 e US\$ 0.50 kg⁻¹ (POIRIER et al., 2002). Em 2002, estimou-se que o preço da comercialização dos biocompostos passou para US\$ 4.00 kg⁻¹, com uma tendência de um crescimento de 20% na produção e diminuição do preço para US\$ 2.00 kg⁻¹ até o ano de 2015. Esse valor ainda chega a ser 50% superior ao valor de mercado dos plásticos convencionais, como o polietileno tereftalato (PET) (BORSCHIVIER et al., 2008).

Assim, estudos estão sendo realizados para tornar o processo de produção de bioplásticos viável economicamente, melhorando a produtividade e desenvolvendo novos processos de separação (KIM et al., 1994).

3.6 *Bradyrhizobium japonicum*

As bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* apresentam crescimento lento com tempo de geração de 7 e 13 horas. Os bradirrizóbios são predominantemente aeróbios e quimiorganotróficos, não esporulam, são gram-negativos e possuem a forma de bastonete, com tamanho variável de 0,5-0,9 x 1,2-3,0 μm (BIZARRO, 2008).

Grânulos de poli-β-hidroxitirato são encontrados com frequência no interior das células. A temperatura ótima para o seu crescimento ocorre em torno de 30°C. Normalmente

são tolerantes à ácidos, a maioria das cepas crescem em pH ácido, porém, produzem uma reação alcalina e o pH tende a subir e elas deixam de crescer com pH acima de 9,0. A maioria das cepas tende a crescer em meio com sais minerais contendo extrato de levedura e glicose, galactose, gluconato, glicerol, frutose, maltose ou arabinose (BIZARRO, 2008).

As bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* são capazes de induzir a nodulação em leguminosas tropicais e temperadas (HOLT et al., 1994; SOMASEGARAN & HOBEN, 1994; SAHGAL e JOHRI, 2003; WILLEMS, 2006). O grupo de bactérias que fixam nitrogênio atmosférico no interior de nódulos em raízes de leguminosas foi inicialmente enquadrado no gênero *Rhizobium*, sendo a denominação baseada essencialmente na interação seletiva do hospedeiro, de acordo com os chamados grupos de inoculação cruzada (FRED et al., 1932). A partir do reconhecimento de que o gênero *Rhizobium* consistia de um grupo de bactérias bastante diverso, determinou a criação de um novo gênero denominado *Bradyrhizobium*. Entre as espécies reclassificadas por Jordan (1982) estava a espécie *Rhizobium japonicum*. Na década de 80 e início da década de 90, vários trabalhos demonstraram a existência de grande variabilidade genética e fisiológica entre as estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* (HOLLIS et al., 1981; STANLEY et al., 1985; MINAMISAWA, 1990).

De acordo com Tombolini e Nuti (1989), o conteúdo deste polímero em *Rhizobium* variou entre 30 a 55% do peso seco celular.

Bonartseva et al. (1994) testaram a capacidade de produção de PHB em várias estirpes de *Rhizobium* com crescimento em meios com diferentes fontes de carbono como sacarose, glicose e galactose, e relataram que o teor de PHB foi de até 65% durante o crescimento num meio de cultura contendo sacarose.

Tavernier et al. (1997) investigaram os efeitos de diferentes fontes de carbono e pH na produção de PHB em estirpes de *Rhizobium* e relataram que as cepas mostraram diferentes taxas médias de crescimento e que houve uma diminuição na produção de PHB no meio que apresentava pH ácido.

Um estudo realizado por Mercan et al. (2002) demonstrou que bactérias do tipo *Rhizobium*, incluindo a *Bradyrhizobium japonicum* são capazes de produzir PHB com altos rendimentos em relação ao peso seco celular. Marcan et. al. (2002) estabeleceu a produção de PHB por *Bradyrhizobium japonicum*. O cultivo foi realizado em pH 7,0, em 48 h de crescimento, utilizando glicose a 1% como fonte de carbono e os resultados obtidos foram 0.43 g/L de PSC, 0,06 g/L de PHB, e rendimento de 13,95%.

3.7 CUSTOS DE PRODUÇÃO

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

O tipo de substrato, bem como os suplementos fornecidos, as condições de cultivo e o micro-organismo utilizado variam de acordo com a composição polimérica desejada (LEE et al., 1995). Segundo Braunegg et al. (2002), as fontes de carbono adequadas para a produção de PHA hoje incluem carboidratos (glicose, frutose e sacarose), alcoóis (metanol e glicerol) alcanos (hexano e dodecano) e ácidos orgânicos (cadeias com 4 carbonos ou mais). As matérias-primas atualmente utilizadas para a produção de PHA são substratos de valor elevado, como sacarose, óleos vegetais, e ácidos graxos (SHEN et al., 2009).

Os preços das matérias-primas para a produção de PHA desempenham um papel crucial para a economia do processo. Segundo Choi e Lee (1997), entre 40% e 48% do custo total de produção foi devido às matérias-primas, sendo a fonte de carbono responsável por 70% a 80% dessa despesa total. Reforçando a influência da fonte de carbono no custo de produção, Braunegg et al. (2004) relataram que 50% do custo de produção deriva justamente do custo relacionado à essa fonte de carbono.

Sendo assim, torna-se essencial uma avaliação dos custos de produção de PHB através de fontes de carbono já utilizadas (glicose, sacarose, lactose...) e compará-los aos custos de produção envolvidos na produção bioplásticos, a partir do uso de fontes alternativas de carbono derivadas de resíduos agroindustriais (glicerol, melão, soro de leite...).

O custo operacional é composto por todos os itens de produção que são representados por meio do dispêndio de capital financeiro realizado em um ciclo produtivo (MATSUNAGA et al., 1976). Dentre os itens necessários para operacionalizar a produção de bioplástico em laboratório e determinar o custo operacional envolvido, pode-se considerar as fontes de carbono e os reagentes envolvidos na preparação do meio de cultura e na produção do bioplástico. Esses custos de produção são classificados como custos variáveis, pois dependem da quantidade produzida. Tem-se ainda, os custos fixos que são aqueles inerentes a produção por mais de um ciclo produtivo, sendo representados pela depreciação dos bens duráveis empregados no processo produtivo, bem como os investimentos realizados em máquinas e equipamentos necessários para a atividade.

3.7.1 Custo fixo

Custos fixos são aqueles que não variam com a quantidade produzida e têm duração superior ao curto prazo, portanto, sua renovação acontece em longo prazo (LOPES e CARVALHO, 2001).

Pode-se citar como exemplo de custos fixos, o capital imobilizado na compra de máquinas, equipamentos, depreciação de bens, materiais de laboratório (vidrarias, pipetas,...), salários, entre outros.

3.7.2 Custo variável

Custos variáveis são aqueles que variam de acordo com a quantidade produzida e, cuja duração é igual ou menor que o ciclo de produção (curto prazo). Em outras palavras, eles incorporam-se totalmente ao produto no curto prazo, não sendo aproveitados para outro ciclo produtivo (LOPES e CARVALHO, 2001).

Como exemplos de custos variáveis encontram-se: a matéria prima (substratos), os reagentes, os meios de cultura, entre outros.

3.7.3 Custo operacional efetivo

São custos operacionais efetivos aqueles nos quais ocorre efetivamente desembolso ou dispêndio de capital financeiro (LOPES e CARVALHO, 2001) necessários para produção em um ciclo produtivo.

$$\text{Custo operacional efetivo} = \text{custos variáveis}$$

3.7.4 Custo operacional total

O custo operacional total refere-se ao custo de todos os recursos de produção que exigem desembolso por parte do investidor (LOPES e CARVALHO, 2001). Ele envolve o custo operacional efetivo adicionado ao custo com a depreciação de bens adquiridos para atender ao processo produtivo.

$$\text{Custo operacional total} = \text{custo operacional efetivo} + \text{custo com depreciação}$$

3.7.5 Custo total

O custo total refere-se ao custo de todos os recursos de produção que envolvem os custos fixos e custos variáveis (LOPES e CARVALHO, 2001). Ele considera o custo operacional total e os investimentos realizados para atender a exploração da atividade.

$$\text{Custo total} = \text{custo operacional total} + \text{investimentos}$$

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRO-ORGANISMO UTILIZADO NOS EXPERIMENTOS

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi a bactéria *Bradyrhizobium japonicum*, cedido pela EMBRAPA Agrobiologia, em Seropédica, RJ.

De acordo com Mercan et al. (2002), *Bradyrhizobium japonicum* é uma espécie capaz de acumular PHB em suas células.

4.2 MANUTENÇÃO DO MICRO-ORGANISMO

Para se conservar o material biológico, estes foram devidamente repicados com auxílio da alça de semeadura, em placas de petri contendo meio DYG's e mantidos sob refrigeração (4°C).

4.3 MEIO DE CULTURA UTILIZADO

Para realização dos experimentos, foi utilizado o meio DYG's de acordo com Döbereiner et al. (1995). Este meio apresentou a seguinte composição: 2 g/L de ácido málico, 1,5 g/L de peptona, 1,5 g/L de extrato de levedura, 0,5 g/L de K₂HPO₄, 0,5 g/L de MgSO₄.7H₂O, 1,5 g/L de ácido glutâmico e 1,0 L de água destilada. O meio foi ajustado para pH igual a 6,5, antes da esterilização. Para o meio sólido, adicionou-se ágar na concentração de 15,0 g/L.

O meio DYG's foi preparado em frascos erlenmeyers de 250 mL, num volume final de 50 mL cada, e autoclavados a 121°C por 15 minutos, deixados em temperatura ambiente para resfriamento (RAMSAY et al., 1990).

4.4 PREPARO DO PRÉ INOCULO E INOCULAÇÃO

Após o resfriamento dos erlenmeyers, com o auxílio de uma alça de semeadura, aproximadamente de 3 a 4 colônias das bactérias foram inoculadas nos frascos contendo o meio de cultura. Esse pré-inóculo foi crescido por 24 h, em shaker rotativo (150 rpm) e a temperatura de 30°C.

Posteriormente ao período de crescimento dos pré-inóculos preparados, o inóculo fresco de cada frasco foi transferido para os demais erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de

meio de cultura, adicionando-se um volume de suspensão bacteriana de modo a se obter uma turbidez inicial de 0,1 D.O./mL. Após a inoculação, os frascos foram incubados a 30°C, de 24 a 48 h em shaker rotativo (150 rpm).

4.5 CRESCIMENTO BACTERIANO

Para determinar o crescimento bacteriano e a produção de PHB (concentração celular), amostras foram retiradas em intervalos de tempo determinados (0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas). O crescimento foi determinado espectrofotometricamente a 620 nm e pela determinação do peso de célula seco (PSC). Na determinação de PSC, alíquotas de 10 mL da cultura foram retiradas em intervalos de tempo determinados, centrifugadas (4000 rpm por 20 min.) e lavadas duas vezes com água destilada em tubos pré-pesados e secas a 105°C até peso constante.

4.6 EFEITO DAS DIFERENTES FONTES DE CARBONO SOBRE O CRESCIMENTO E A PRODUÇÃO DE PHB

Para se verificar o efeito da fonte de carbono no crescimento e produção de PHB, o micro-organismo foi cultivado em meio DYG's adicionado das seguintes fontes de carbono: glicose, sacarose, lactose, glicerol, melão e soro de leite, nas concentrações de 1%, 2% e 3%.

Após realizados todos os testes, as fontes de carbono tiveram seus custos operacionais avaliados e comparados com o custo de produção de bioplásticos obtidos a partir da sacarose, sendo esta utilizada como tratamento controle.

Frascos de erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura foram inoculados com inóculo fresco e incubados a 30°C, em shaker rotativo (150 rpm). O inóculo foi preparado crescendo-se os micro-organismos em caldo nutritivo.

4.7 EFEITO DO pH NA PRODUÇÃO DE PHB

Para se verificar o efeito do pH na produção de PHB, *Bradyrhizobium japonicum* foi crescida em meio DYG's juntamente com as fontes de carbono glicose, sacarose, lactose, glicerol, melão e soro de leite.

Os pH foi ajustado com a utilização do hidróxido de potássio (KOH) a 10%. Os valores de pH testados foram: 5,0; 6,0; 6,5; 7,0 e 8,0.

4.8 EFEITO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE PHB

Após analisar os resultados de produção de PHB sob a influência do pH, o melhor resultado foi selecionado para realizar a variação de temperatura.

Com o pH ajustado, os ensaios foram realizados nas temperaturas de 25°C, 30°C e 35°C. Temperaturas acima das avaliadas neste experimento podem promover a morte das colônias, o que inviabilizaria a realização deste trabalho.

As variações de temperatura foram realizadas para verificar a influência desses tratamentos na eficiência da produção do PHB.

4.9 PRODUÇÃO DE PHB

A produção de PHB foi determinada como descrito por Poomipuk et al. (2014). Uma amostra de 10 mL da cultura foi centrifugada (4000 rpm, 20 min.), em intervalos de tempo determinados (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h). O precipitado formado foi ressuscitado em 10 mL de hipoclorito de sódio comercial. Após 1 hora a 37°C, para permitir a lise das células, os grânulos de PHB foram coletados por centrifugação a 4000 rpm por 20 min. O precipitado formado foi lavado com água destilada e acetona. Em seguida, o precipitado formado foi dissolvido em clorofórmio fervente e filtrado. Após o clorofórmio ser evaporado a temperatura ambiente, o filme de PHA formado foi pesado. A porcentagem de PHB foi definida como a razão entre PHB e o PSC.

4.10 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As amostras de *Bradyrhizobium japonicum* foram cultivadas em laboratório, utilizando o meio de cultura DYG'S, a partir do fornecimento de diferentes açúcares (sacarose, glicose, lactose) e de diferentes fontes de resíduos agroindustriais (glicerol, melão e soro de leite) como fonte de carbono, nas concentrações de 1%, 2% e 3%. Maiores concentrações da fonte de carbono podem inibir o crescimento do micro-organismo. O cultivo foi realizado sob três condições de temperatura (25°C, 30°C e 35°C) e cinco variações de pH (5,0, 6,0, 6,5, 7,0 e 8,0) ajustados com KOH, visando identificar as melhores condições de crescimento dos micro-organismos e a maior obtenção na produção de PHB, em função da fonte de carbono e concentração utilizada. Os dados obtidos foram analisados por meio de estatística descritiva, sendo determinada a média e o desvio-padrão, provenientes de três repetições para cada tratamento testado.

4.11 ANÁLISE DO CUSTO DE PRODUÇÃO

Na produção do bioplástico realizada em laboratório foram identificados e quantificados todos os itens envolvidos. Uma vez realizada a análise e obtida a produção de bioplástico, identificou-se todos os custos envolvidos no processo produtivo, sendo estes classificados em custos fixos e custos variáveis. A partir destes, determinou-se o custo operacional, de acordo com a metodologia proposta por Matsunaga et al. (1976), considerando somente os custos variáveis necessários para a realização da análise laboratorial.

Os componentes financeiros do custo operacional foram separados em categorias, sendo elas: meio de cultura, fonte de carbono e reagentes. Para o preparo do meio de cultura líquido foram utilizados como insumos, o ácido málico, a peptona bacteriológica, o extrato de levedura, o fosfato de potássio dibásico, o sulfato de magnésio, o ácido glutâmico e o hidróxido de potássio, sendo adicionada a cultura bacteriana (*Bradyrhizobium japonicum*). Para a manutenção da cultura em meio sólido, acrescentou-se o ágar bacteriológico.

Na obtenção do PHB foram utilizados como reagentes químicos o hipoclorito de sódio, a acetona e o clorofórmio.

Na análise laboratorial utilizando o soro de leite como fonte de carbono, utilizou-se ainda, o ácido clorídrico para realizar a desproteinização do soro e obtenção do açúcar (lactose).

As fontes de carbono utilizadas nos processos de produção de bioplástico foram: sacarose, glicose, lactose, glicerol, melão e soro de leite, sendo a fonte de carbono sacarose considerada como tratamento testemunha e as demais fontes tiveram seus custos determinados e comparados à sacarose (tratamento testemunha).

Os preços dos componentes envolvidos na produção de bioplástico e necessários para determinação do custo operacional foram cotados, mensalmente, durante o período compreendido entre setembro de 2013 e dezembro de 2014. Todo o levantamento e as informações foram tabulados em planilhas MS-Excel[®]. Sobre os preços levantados, aplicou-se o Índice Geral de Preços - Disponibilidade interna (IGP-DI), publicado pela Fundação Getúlio Vargas (FGV, 2015) para a correção monetária dos valores absolutos levantados, mensalmente. Assim, os preços praticados durante o período de estudo foram deflacionados, ou seja, corrigidos monetariamente. Adotou-se como mês base para realização da análise de custo dos tratamentos realizados, o mês de abril do ano de 2015, sendo este considerado a base 100. A partir da atualização monetária dos preços praticados foi determinado o preço médio para cada item envolvido na determinação do custo operacional necessário para a produção de PHB em laboratório.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a finalidade de avaliar a influência de diferentes fontes de carbono sobre a produção do PHB, glicose, sacarose, lactose, glicerol, melão e soro de leite foram testados como fonte de carbono nas concentrações de 1%, 2% e 3%. As condições iniciais foram a temperatura de 30°C e pH de 6,5. As análises foram realizadas a cada 24 h por cinco dias consecutivos. Os melhores resultados, levando em consideração as médias das triplicatas e o desvio padrão entre elas, foram selecionados de acordo com a maior produção de PHB para cada concentração da fonte de carbono. A partir daí, algumas condições como temperatura e pH sofreram variações. O pH foi variado para 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 e a temperatura para 25°C e 35°C. Os resultados de produção de PHB pelas diferentes fontes de carbono foram comparados entre si e com dados da literatura.

As diferentes fontes de carbono tiveram seus custos operacionais determinados e analisados comparativamente.

As Figuras 3, 4, 5, 6, 7 e 8 demonstram o crescimento da cultura através da análise do peso seco de célula (PSC), a produção de poli-3-hidroxi-butarato (PHB), a variação de pH ao longo do crescimento e a produtividade de PHB em relação ao PSC, para cada uma das fontes de carbono testadas. As condições estabelecidas foram temperatura a 30°C, pH inicial de 6,5, e as análises foram feitas a cada 24 h em cinco dias consecutivos (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h).

5.1 EFEITO DAS FONTES DE CARBONO NA PRODUÇÃO DE PHB

Foi verificado para todos os testes que os melhores resultados para a produção de PHB, levando em consideração as concentrações das fontes de carbono, foram obtidos com o tempo de 48 h de cultivo. Após esse tempo, observou-se um declínio na concentração e no conteúdo de PHB, indicando o início do consumo do PHB pelas bactérias. Como esse polímero é uma fonte de reserva de carbono e energia, pode ser degradado para suprir as necessidades da célula. Sua degradação intracelular poderia explicar os baixos valores de concentração de PHB alcançados no final do cultivo (a partir de 72 h até 120 h de cultivo). Na figura a seguir estão apresentados os resultados do crescimento bacteriano e da produção do PHB com a utilização da sacarose como fonte de carbono:

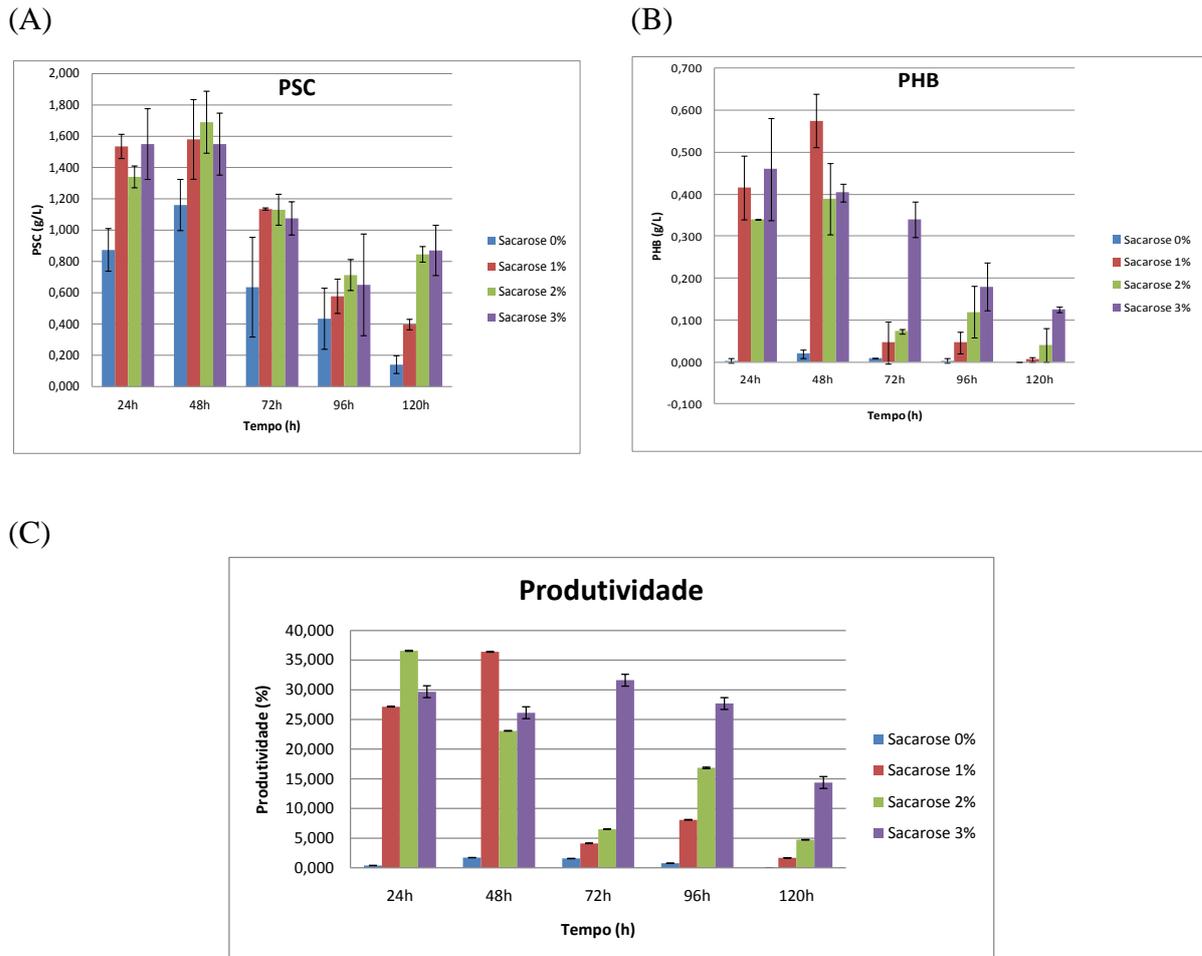


Figura 3. Crescimento de *Bradyrhizobium japonicum* (A), produção de PHB (B) e produtividade de PHB em relação ao PSC (C), quando cultivado em meio DYG's acrescido de sacarose nas concentrações de 0%, 1%, 2% e 3%. Cultivo realizado a 30°C e 150 rpm.

Na Figura 3A, observou-se que, para todas as concentrações de sacarose, os valores maiores encontrados para o Peso Seco Celular (PSC) se apresentaram em 48 h de crescimento. Após esse tempo, observou-se queda constante nas taxas de crescimento. Os maiores valores de PSC foram na concentração de 2% (1,69 g/L), 1% (1,58 g/L) e 3% (1,55 g/L). Essa diminuição ocorre uma vez que ao longo do tempo o substrato presente na cultura vai sendo consumido pelas bactérias. Isso faz com que não haja mais alimento e a cultura pare de crescer, diminuindo sua população. O ligeiro aumento de PSC ao final das análises (120 h) para algumas concentrações pode ser explicado pelo fato de que, a medida em que o substrato vai diminuindo na cultura, as bactérias começam a consumir esse substrato intracelular acumulado sob a forma de polímero.

Assim como os resultados do Peso Seco Celular, as maiores taxas de acumulação de PHB foram obtidas com 48 h de crescimento (Figura 3B). Porém, as maiores médias foram obtidas para as concentrações de 1% (0,57 g/L), 3% (0,40 g/L) e 2% (0,39 g/L). A diminuição

na produção de PHB ocorreu pelo mesmo motivo que a diminuição do PSC na fase intermediária de crescimento, ou seja, a concentração do substrato diminuiu na cultura, e essa concentração continuou diminuindo justamente por ele ser uma fonte de carbono e energia, assim, as bactérias consumiram o PHB que elas acumularam na forma de grânulos no seu citoplasma, suprimindo suas necessidades energéticas. Maiores valores de PSC não refletiram em maiores valores de PHB, pois nem sempre elas convertem toda a fonte de carbono em PHB. A cultura pode estar crescendo devido ao consumo efetivo da fonte de carbono, e não necessariamente do seu acúmulo em forma de polímero.

Quando analisada a proporção entre PSC e PHB, as maiores porcentagens de acumulação de PHB em relação ao PSC foram na concentração de 1%, com análise feita em 48 h, onde o valor chegou a 36,39% (Figura 3D) e com concentração de 2% com 24 h, onde o valor foi de 36,54%.

Esses dados apontaram uma produção efetiva de PHB utilizando a sacarose como fonte de carbono para *Bradyrhizobium japonicum*.

Ressalta-se que as empresas que hoje produzem PHA em escala piloto ou industrial utilizam sacarose ou glicose como fonte de carbono para a produção de PHB (PRADELLA, 2006) em forma de realimentação em batelada, o que gera uma produção de PHB por hora bem maior do que os testes realizados em laboratório. Wong e Lee (1997) estudaram a produção de PHB por *Alcaligenes latus* em batelada a partir de sacarose. A obtenção de PSC foi de 111,7 g/L e 98,7 g/L de PHB, correspondente a 88% e produtividade de 4,94 g/L h⁻¹.

Industrialmente a bactéria utilizada tem sido a *Ralstonia eutropha*, que não é capaz de assimilar sacarose, sendo necessária a inversão prévia desse substrato, o que aumenta ainda mais o custo de produção (SQUIO e ARAGÃO, 2004; SILVA et al., 2007). Fava (1997) desenvolveu uma cepa modificada com habilidade em consumir sacarose, porém, com eficiência de crescimento e produção de PHB inferior em relação ao que é produzido utilizando glicose como fonte de carbono. Nesse estudo, foram utilizadas glicose, frutose e sacarose. Quando utilizou-se glicose e frutose o rendimento foi de até 79% e com a sacarose foi de 58%.

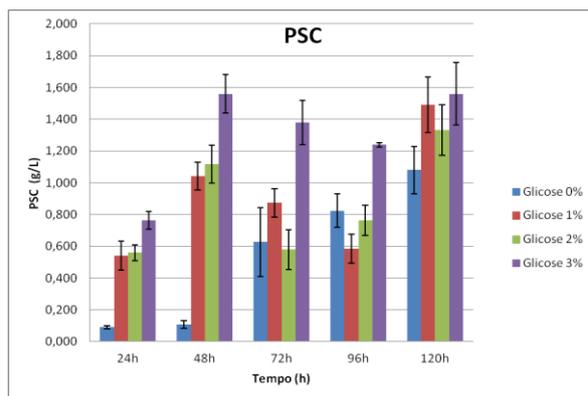
Gomez et al. (1996) avaliaram a eficiência de produção de PHA's por diversas bactérias gram-negativas, isoladas do solo de plantações de cana-de-açúcar. Os cultivos foram realizados utilizando-se como carboidratos a sacarose, glicose e frutose. Quando foi usada sacarose como fonte de carbono, alguns micro-organismos mostraram valores de rendimento maiores em produção, que a partir do uso de glicose e/ou frutose. Os autores explicaram o

fato afirmando que a mesma massa de sacarose gera 5% mais acetil-CoA e, por consequência PHA, que as fontes de glicose e frutose. Entre os micro-organismos isolados, a *Burkholderia sp.* foi capaz de acumular 75% do seu peso seco em PHB a partir de glicose mais frutose e 69% a partir de sacarose, com uma eficiência maior que 80% do máximo rendimento teórico, que foi de 0,48 g/L quando se utilizou glicose e/ou frutose, e de 0,5 g/L quando se usou sacarose, de acordo com Yamane (1993).

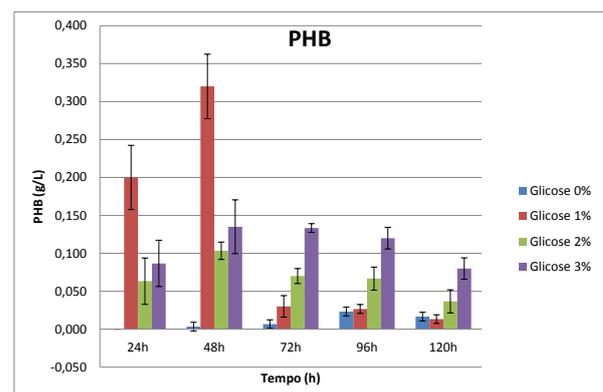
Nas condições testadas inicialmente (30°C e pH 6,5), observou-se que o maior valor obtido para a produção de PHB a partir de sacarose (1%) como fonte de carbono foi de 0,57 g/L, em 48 h de cultivo e o valor para PSC foi de 1,58 g/L, sendo observado um rendimento de PHB em relação ao PSC, na ordem de 36,39%. Os dados obtidos corroboraram com aqueles publicados por Yamane (1993) que obteve 0,50 g/L, quando utilizou sacarose como fonte de carbono. Os valores semelhantes indicaram que *Bradyrhizobium japonicum* e *Burkholderia sp.* possuem eficiências semelhantes na produção de PHB, apesar de *B. japonicum* ter apresentado rendimento inferior quando comparado ao rendimento de 69% obtido por Yamane (1993), quando o autor trabalhou com sacarose como fonte de carbono.

A Figura 4 apresenta os resultados referentes ao crescimento do micro-organismo através do peso seco celular, assim como a produção de PHB e a produtividade de PHB em relação ao PSC, quando a fonte de carbono utilizada foi a glicose.

(A)



(B)



(C)

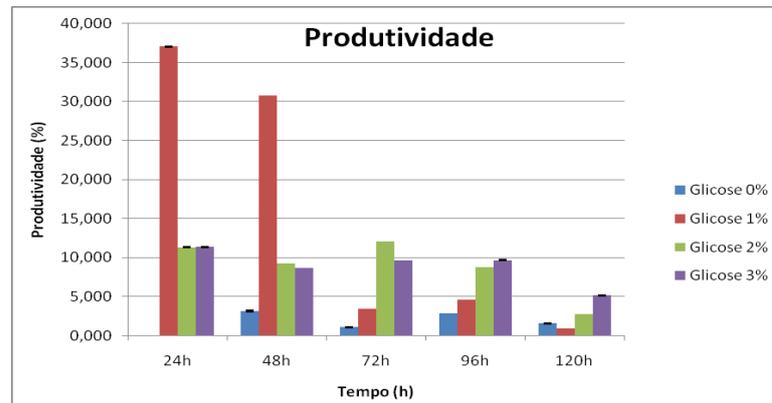


Figura 4. Crescimento de *Bradyrhizobium japonicum* (A), produção de PHB (B) e produtividade de PHB em relação ao PSC (C), quando cultivado em meio DYG's acrescido de glicose nas concentrações de 0%, 1%, 2% e 3%. Cultivo realizado a 30°C e 150 rpm.

Em relação ao Peso Seco Celular (PSC), a maioria das concentrações utilizadas houve um pico em 48 h, com um ligeiro decréscimo em 72 h, sendo observado um novo aumento nos valores de PSC a partir de 96 h (Figura 4A). Esse aumento do PSC observado em torno de 120 h de cultivo é mais uma vez explicado pelo acúmulo inicial da fonte de carbono em forma de grânulos intracelulares e posterior consumo. Isso explica a diminuição inicial da concentração de células, pois diminuiu a fonte de carbono disponível e depois elas voltaram a crescer pois consumiram o substrato acumulado. O maior valor considerado para PSC ocorreu com 48 h de cultivo (Figura 4A) tendo sido de 1,56 g/L (3%), 1,11 g/L (2%) e 1,04 g/L (1%).

As maiores taxas de acumulação de PHB se concentraram em 48 h para todas as concentrações testadas (Figura 4B). A maior produção foi quando se utilizou a concentração de 1% de glicose (0,32 g/L). O fato da acumulação de PHB ter tido um comportamento decrescente, independente do aumento no PSC ao longo do tempo, demonstra que houve o consumo do polímero intracelular. Apesar da maior produção de PSC ter sido utilizando a glicose a 3% o mesmo não se observa para o PHB, que foi com concentração de 1%. Esse fato demonstra que maiores concentrações da fonte de carbono nem sempre serão convertidas em grânulos de PHB.

A maior proporção de acúmulo de PHB em relação ao PSC foi na concentração de 1%, com análise feita em 24 h, com valor de 37,03% (Figura 4C).

Em estudos envolvendo aumento da eficiência da produção de PHB por microorganismos, Kawai (2013) demonstrou, que usando a glicose como fonte de carbono para a bactéria *Pseudomonas sp.*, a produção se apresentou em torno de 0,32 g/L, com rendimento

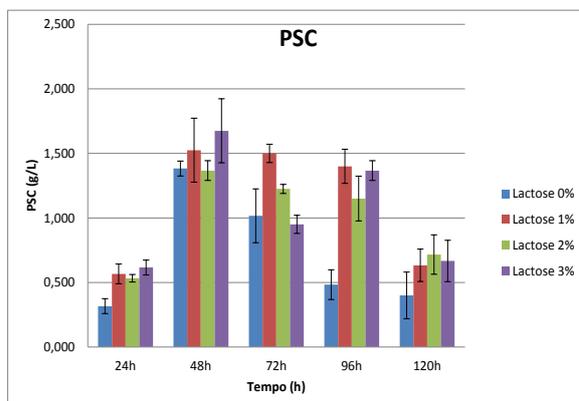
de 19,34% em relação ao PSC. Yamane (1993), cultivando *Ralstonia eutropha*, obteve 75% de rendimento com produção de 0,48 g/L de PHB quando usou glicose como fonte de carbono.

Comparando os dados obtidos quando se utilizou a glicose a 1% para o crescimento e produção de PHB por *Bradyrhizobium japonicum*, verificou-se que ela produziu pouco menos da quantidade de PHB e de produtividade do que *Ralstonia eutropha* (YAMANE, 1993), uma vez que se obteve 0,32 g/L com *B. japonicum* e 0,48 g/L de PHB com *R. eutropha*, respectivamente. O mesmo pode-se afirmar pela produtividade obtida que foi 37,03% e 75%, respectivamente. Ainda assim, os dados apontam para uma eficácia da produção de PHB pela bactéria *Bradyrhizobium japonicum* e os resultados podem ser melhorados adequando as condições de cultivo.

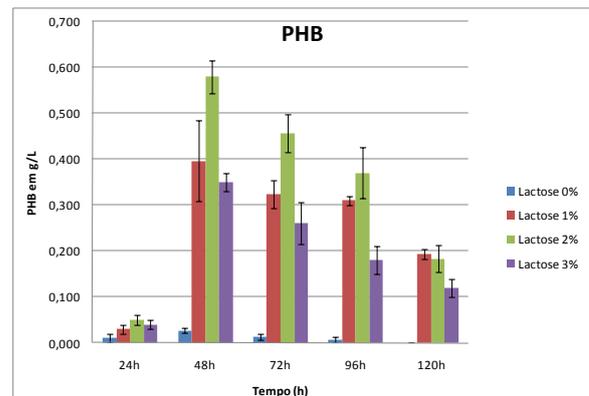
Mercan et al. (2002) realizaram testes com várias espécies do gênero *Rhizobium*, incluindo *Bradyrhizobium japonicum*. Como fonte de carbono foram utilizadas glicose e sacarose combinadas, na concentração de 1%. Os resultados obtidos em pH 7,0 e após 48 h de cultivo foram de 0,43 g/L de PSC, 0,06 g/L de PHB, com 13,95% de rendimento. Comparando esses valores com os obtidos no presente trabalho, verificou-se que quando se utilizou apenas uma fonte de carbono (glicose ou sacarose) os valores obtidos no presente trabalho foram mais satisfatórios.

Analisando a fonte de carbono lactose determinou-se o peso seco celular, a produção de PHB e a produtividade (Figura 5).

(A)



(B)



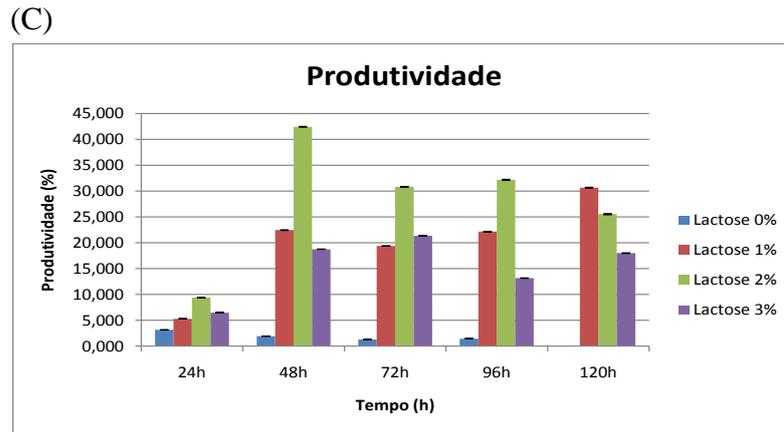


Figura 5. Crescimento de *Bradyrhizobium japonicum* (A), produção de PHB (B) e produtividade de PHB em relação ao PSC (C), quando cultivado em meio DYG's acrescido de lactose nas concentrações de 0%, 1%, 2% e 3%. Cultivo realizado a 30°C e 150 rpm.

Os maiores valores encontrados para o PSC se apresentaram em 48 h de crescimento, sendo foram na concentração de 3% (1,86g/L), seguidos de 1% (1,76 g/L) e 2% (1,36 g/L).

A figura 5B mostra a produção de PHB, onde as maiores taxas de acumulação foram observadas após 48 h de crescimento para todas as concentrações. Porém, as maiores médias foram obtidas para as concentrações de 2% (0,58 g/L), 1% (0,39 g/L) e 2% (0,35 g/L) respectivamente. A mudança abrupta de acúmulo de PHB de 24 h para 48 h se dá pela fase inicial de crescimento da bactéria, que tende a ser menor, pois é uma fase de adaptação às condições, inclusive à fonte de carbono.

Quando analisada a proporção entre PSC e PHB, a maior porcentagem de acumulação de PHB em relação ao PSC foi na concentração de 2%, com análise realizada em 48 h com valor de 42,42% (Figura 5C). Assim como para a glicose, apesar de o maior valor de PSC ter sido com concentração de 3% de lactose, a maior produção de PHB e produtividade foi utilizando a concentração de 2%, o que demonstrou que nem toda fonte de carbono é convertida em PHB.

Ahn et al. (2000) investigaram o crescimento de *R. eutropha* em lactose hidrolisada. A bactéria mostrou-se capaz de se desenvolver muito bem nesse substrato, com rendimento em torno de 37%. Esse trabalho não apresentou os dados absolutos da produção de PHB somente o rendimento, que pode ser comparado ao encontrado no presente trabalho, onde se obteve 42,42% de rendimento de PHB em relação ao PSC quando utilizando soro de leite como fonte de carbono para *Bradyrhizobium japonicum*.

Kim et al. (1992) avaliaram a produção de PHB por *Escherichia coli* e obtiveram como resultado 0,48 g/L de PHB com 80% de produtividade. Em termos de produção

absoluta de PHB, no presente trabalho observou-se uma maior produção de PHB por *Bradyrhizobium japonicum*, que foi de 0,58 g/L, porém com rendimento menor, de 42,42%. Melhorias na técnica de extração da lactose do soro podem ser realizadas para que a eficiência no rendimento seja maior.

Com o intuito de estudar diferentes fontes de carbono provenientes de resíduos agroindustriais foram realizados testes com glicerol, melação e soro de leite (Figuras 6, 7 e 8) Analisando o glicerol como fonte de carbono para a produção de PHB foi observado o comportamento do crescimento do micro-organismo através do peso seco celular, assim como a produção de PHB e sua produtividade em relação ao peso seco celular (Figura 6).

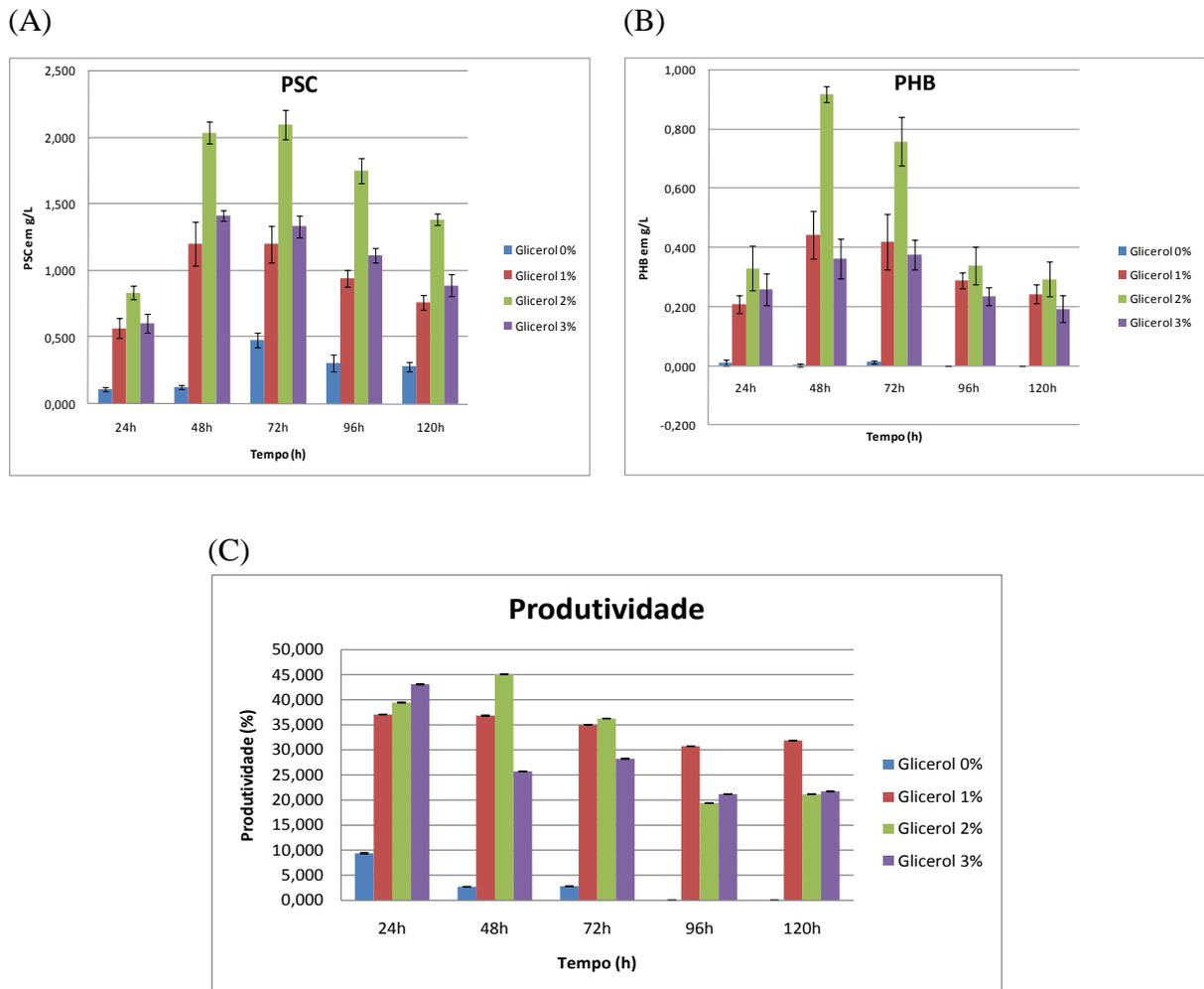


Figura 6. Crescimento de *Bradyrhizobium japonicum* (A), produção de PHB (B), e produtividade de PHB em relação ao PSC (C), quando cultivado em meio DYG's acrescido de glicerol 0%, 1%, 2% e 3%. Cultivo realizado a 30°C e 150 rpm.

O Peso Seco Celular (PSC) apresentou taxas maiores para a concentração de 2% obtendo 2,04 g/L de PSC em 48 h não variando muito para 72 h (2,09 g/L). Para as

concentrações de 1% e 3% os valores foram de 1,20 g/L e 1,48 g/L, respectivamente em 48 h de crescimento (Figura 6A).

Os maiores valores de acumulação de PHB ocorreram em 48 h, com médias de 0,44 g/L, 0,92 g/L e 0,37 g/L, respectivamente para as concentrações de 1%, 2% e 3% de glicerol utilizado como fonte de carbono para o crescimento microbiano (Figura 6B).

Quando analisada a razão entre PSC e PHB, a maior porcentagem de acumulação de PHB em relação ao PSC foi na concentração de 2%, com análise feita em 48 h, apresentando valor de 45,09% (Figura 6C). Para a concentração de 3%, observou-se o crescimento máximo em 24 h com valor de 43,09%, enquanto que para a concentração de 1%, o rendimento máximo foi de 37,05% em 24 h.

Mainka (2013) testando a produção de PHB usando como fonte de carbono o glicerol, observou a produção em torno de 1,2 g/L do polímero, com 48 h de crescimento bacteriano de *Bacillus megaterium*. Em estudo realizado por Figueiredo et al. (2014), foi observada a produção de PHB por *Cupriavidus necator* com produção de 1,62 g/L e rendimento de 16%.

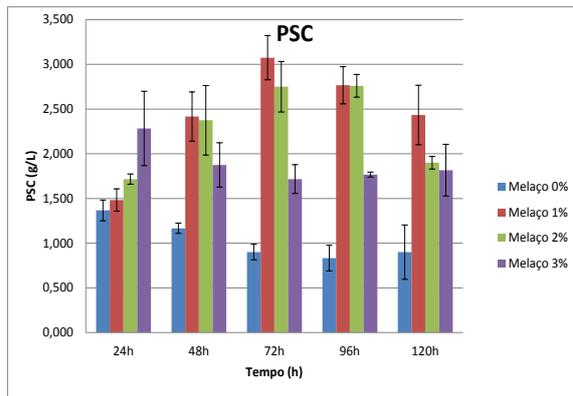
Posada et al. (2011) realizaram uma análise técnico-econômica para a produção de PHB a partir de glicerol bruto. Os resultados em termos de produtividade ficaram entre 37% e 53% de rendimento.

No presente estudo, o glicerol apresentou 0,92 g/L quando a concentração do mesmo foi de 2% e rendimento de 44% para a mesma concentração. Esses dados corroboram com os estudos feitos por Posada et al. (2011) em termos de rendimento (de 37% a 53%) e com Mainka (2013) em termos de valores absolutos (1,2 g/L).

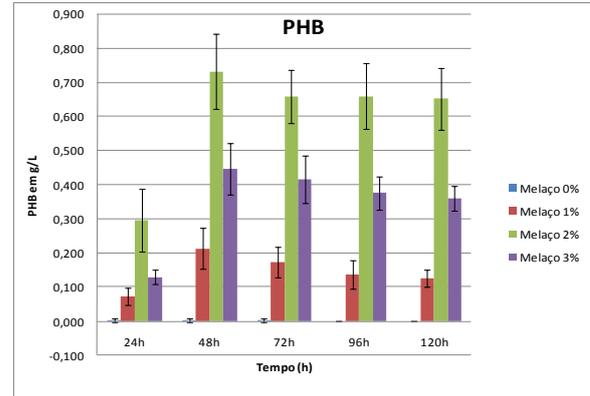
Tanto os dados encontrados na literatura quanto os dados obtidos no presente trabalho demonstraram que o glicerol quando utilizado como fonte de carbono apresentou maior produção de PHB, quando comprada às fontes sacarose e glicose. A explicação para um maior rendimento com glicerol quando comparado com a sacarose e a glicose pode ser na degradação da cadeia carbônica de cada uma dessas fontes de carbono. O glicerol é o composto que apresenta a menor cadeia carbônica ($C_3H_8O_3$) comparado com a glicose ($C_6H_{12}O_6$) e a sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), sendo assim, pode ser mais rapidamente degradado pelos micro-organismos (NELSON e COX, 2002).

O mesmo estudo foi conduzido avaliando os aspectos (PSC, PHB e produtividade), quando se utilizou o melão como fonte de carbono (Figura 7).

(A)



(B)



(C)

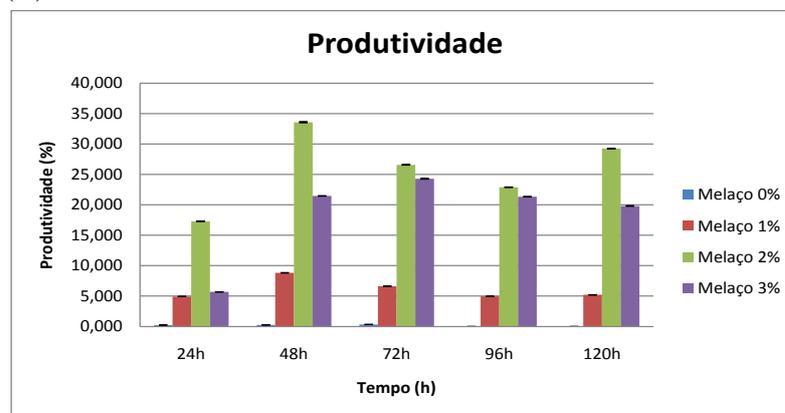


Figura 7: Crescimento de *Bradyrhizobium japonicum* (A), produção de PHB (B), e produtividade de PHB em relação ao PSC (C), quando cultivado em meio DYG's acrescido de melaço nas concentrações de 0%, 1%, 2% e 3%. Cultivo realizado a 30°C e 150 rpm.

Analisando o Peso Seco Celular (PSC), para as concentrações de 1% e 2%, os maiores valores obtidos foram em 72 h com picos de 3,07 g/L e 2,7 g/L, respectivamente (Figura 7A). Para a concentração de 3%, observou-se que o pico ocorreu em 24 h com valor de 2,2 g/L e a partir desse tempo observou-se decréscimo constante.

Para todas as concentrações, as maiores taxas de acumulação de PHB ocorreram em 48 h (Figura 7B), sendo que o maior valor obtido foi para a concentração de 2%, produzindo 0,73 g/L, seguido da concentração de 3%, com acumulação de 0,44 g/L e 1%, com 0,21 g/L.

A maior produtividade, quando relacionando PSC com PHB, ocorreu para 2% em 48 h, com rendimento de 33,5% (Figura 7C).

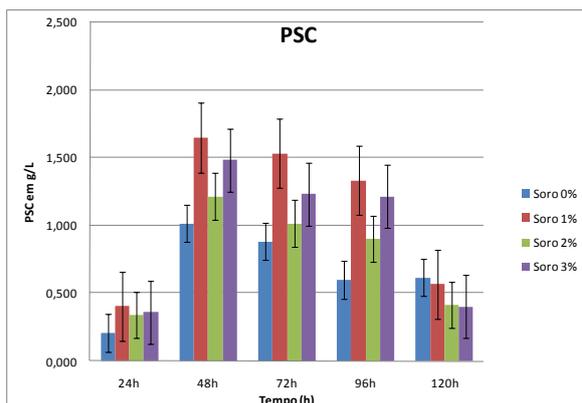
O melaço considerado um subproduto agroindustrial tem sido largamente utilizado como fonte de carbono em fermentações com leveduras para produção de álcool. Além de ser mais barato que a glicose, o melaço contém elementos traços e vitaminas que podem ser usados como potencializadores do crescimento microbiano.

Liu et al. (1998) estudaram a produção de PHB por *E. coli* recombinante, utilizando melaço hidrolisado como única fonte de carbono. A cultura foi realizada em batelada alimentada e resultou em 39,5 g/L de peso seco celular, 80% de PHB com produtividade de 1 g/L h. Relataram que a concentração de melaço teve efeito significativo na síntese de PHB e no crescimento das células. No estudo, a concentração de melaço no meio foi gradualmente aumentada de 26,5 para 144,0 g/L. Os autores observaram que a biomassa residual foi inibida pela alta concentração de melaço, enquanto o conteúdo de polímero aumentou até o final da cultura, ou seja, altas concentrações de melaço resultaram em altos conteúdos de PHB.

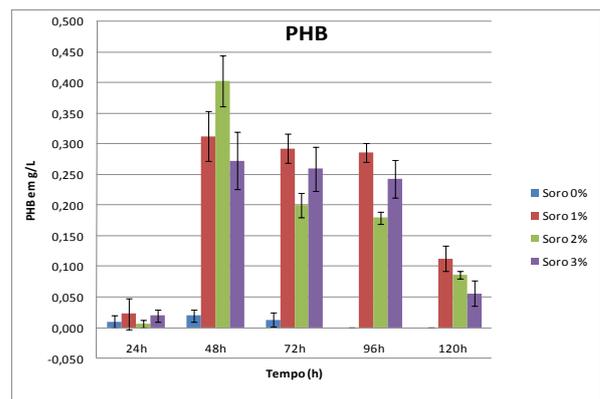
Em estudo realizado por Abe (2010) foi demonstrada uma produção de PHB utilizando o melaço como fonte de carbono em culturas mistas, chegando a 0,5 g/L. No presente estudo foi obtida uma produção de 0,73 g/L de PHB pela bactéria *Bradyrhizobium japonicum* quando o melaço foi utilizado na concentração de 2%. Esse resultado demonstrou que a produção foi superior (0,5 g/L) a encontrada por Abe (2010), salientando que o melaço quando utilizado como fonte de carbono permitiu maior eficiência produtiva apenas pela *Bradyrhizobium japonicum*.

Proveniente do beneficiamento do leite na indústria de laticínios, o soro do leite foi outro resíduo agroindustrial avaliado como fonte de carbono para a produção de PHB, sendo determinado o peso seco celular, a produção de PHB e a produtividade de PHB em relação ao PSC, em condições de laboratório (Figura 8).

(A)



(B)



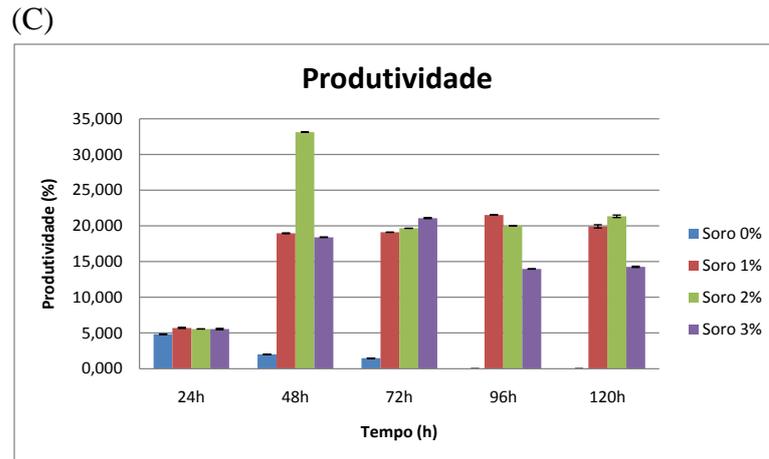


Figura 8. Crescimento de *Bradyrhizobium japonicum* (A), produção de PHB (B) e produtividade de PHB em relação ao PSC (C), quando cultivado em meio DYG's acrescido de soro de leite nas concentrações de 0%, 1%, 2% e 3%. Cultivo realizado a 30°C e 150 rpm.

Utilizando o soro de leite como fonte de carbono, o Peso Seco Celular, em todas as concentrações utilizadas apresentou melhores resultados em 48 h (Figura 8A), com um ligeiro decréscimo a partir de 72 h. O maior valor observado ocorreu na concentração de 1% com produção de 1,65 g/L, seguidos de 3% e 2%, com valores de 1,48 g/L e 1,21 g/L, respectivamente.

Assim como para os resultados obtidos pelo Peso Seco Celular, os maiores valores de acumulação de PHB (Figura 8B) se concentraram também em 48 h. A melhor taxa de produção foi para a concentração de 2%, com valor de 0,40 g/L de acumulação.

A maior proporção de acúmulo de PHB em relação ao PSC foi mais uma vez na concentração de 2%, com análise feita em 48 h, com valor de 33,1% (Figura 8C).

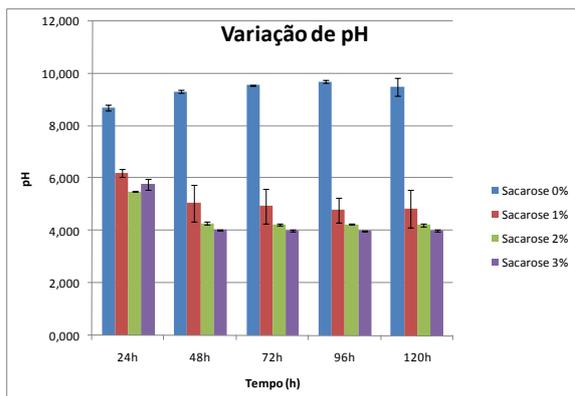
Wong e Lee (1998) estudaram a produção de PHB em culturas de alta densidade de células de *Escherichia coli* recombinante, em batelada alimentada, utilizando soro de leite concentrado como fonte de carbono. Neste estudo, os autores obtiveram 87 g/L de células e 69 g/L de PHB, perfazendo um total de 80% de polímero com produtividade de 1,4 g/L em 48 h. Apesar de terem obtido valores de concentração e produtividade de polímeros menores que com fontes de carbono puras, relataram que sua produção pode ser econômica principalmente se incorporada a uma indústria de laticínios, agregando valor ao efluente. Ressalta-se que este estudo foi feito em batelada alimentada, ou seja, promoveu-se a realimentação dos microorganismos com o substrato testado, justificando assim os altos valores obtidos na produção de PHB.

Utilizando soro de leite como fonte de carbono, Kim et al. (1992) avaliaram a produção de PHB por *Escherichia coli* recombinante e obtiveram produtividade de PHB de 0,48 g/L e rendimento de 57% em relação ao peso seco celular. Esses valores podem ser comparados aos valores encontrados no presente estudo, onde *Bradyrhizobium japonicum* foi capaz de acumular 0,40 g/L de PHB com rendimento de 33%.

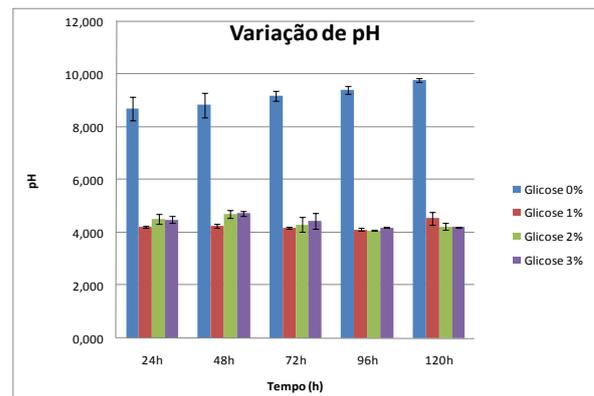
Avaliando todos os valores de produção de PHB com as diferentes fontes de carbono testadas, com cultivo realizado em pH 6,5 e temperatura de 30°C, o glicerol foi a fonte de carbono que apresentou a maior produção de PHB com 0,92 g/L em 48 h de cultivo.

Outro aspecto avaliado ao longo do tempo de cultivo foi o comportamento do pH (Figura 9). Não foi realizado o controle do pH ao longo do crescimento do micro-organismo e produção de PHB, apenas avaliado o seu comportamento. O pH inicial, para todas as fontes de carbono foi ajustado para 6,5, com utilização do hidróxido de potássio. A cada 24 h foi realizada a medição do pH, observando-se se houve ou não a ocorrência de variação.

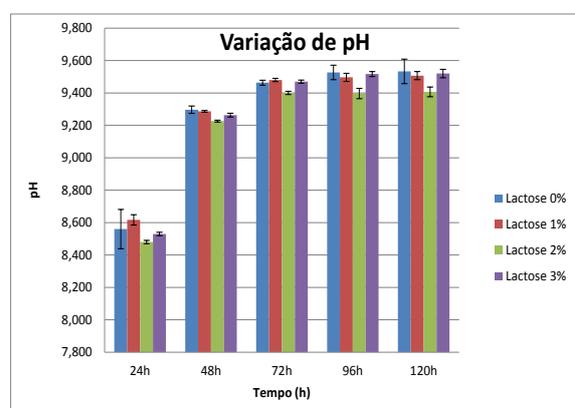
(A)



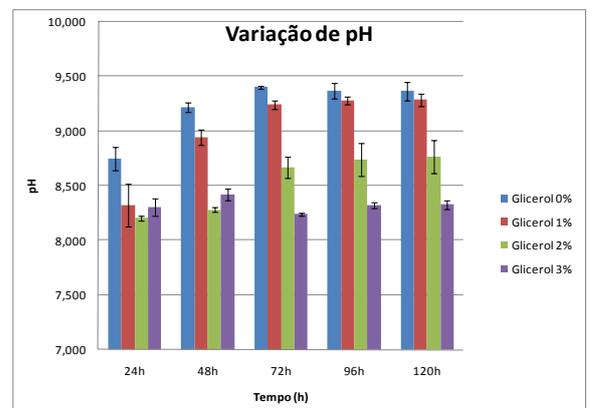
(B)



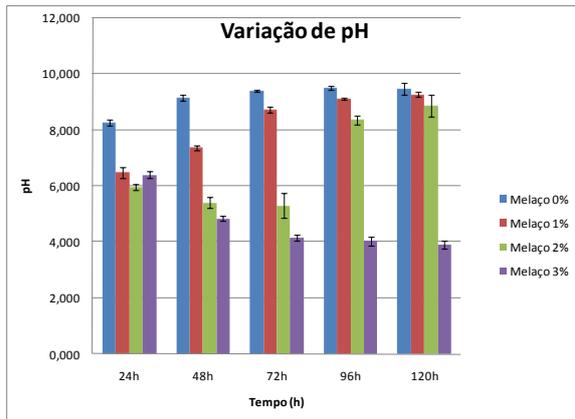
(C)



(D)



(E)



(F)

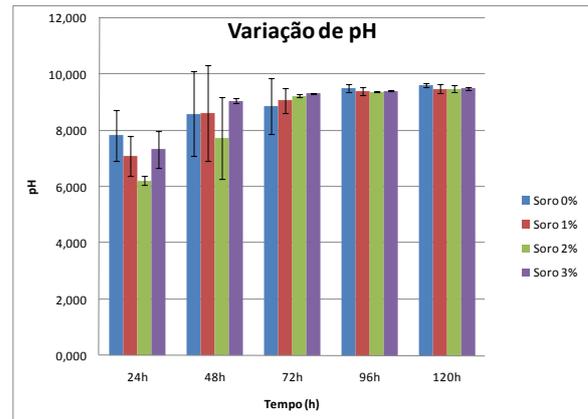


Figura 9. Variação do pH, quando cultivado em meio DYG's acrescido de sacarose (A), glicose (B), lactose (C), glicerol (D), melaço (E) e soro de leite (F), nas concentrações de 0%, 1%, 2% e 3%. Cultivo realizado a 30°C e 150 rpm.

Para todas as fontes de carbono testadas, o pH do meio de cultura foi ajustado para 6,5 e às análises foram realizadas a cada 24 h para verificar o comportamento do pH ao longo do crescimento da cultura.

Quando utilizada a fonte de carbono sacarose (Figura 9A), observou-se variação do pH que apresentou queda de 6,5 para 6,0 com 24 h de crescimento da cultura. Após esse tempo, o pH oscilou entre 4,0 e 5,0 até o tempo de 120 h para todas as concentrações utilizadas. A própria fonte de carbono ou o metabolismo da bactéria podem ter influenciado nesse comportamento do pH.

Para as concentrações de glicose utilizadas a partir de 48 h, o pH permaneceu entre 4,0 e 4,5 (Figura 9B).

O pH aumentou nas primeiras 48 h e se manteve praticamente constante em torno de 9,3 e 9,5 ao longo das 120 h para todas as concentrações, quando a fonte de carbono utilizada foi a lactose (Figura 9C).

Utilizando o glicerol como fonte de carbono pelo tempo de 48 h, o pH oscilou entre 8,0 e 9,5. Observou-se que quanto menor foi a concentração utilizada (0% e 1%), o pH ficou próximo a 9,0, ao passo que quanto maior a concentração (2% e 3%), o pH situou-se próximo a 8,0, mantendo-se essa tendência até 120 h de cultivo (Figura 9D).

Quando utilizada a fonte de carbono melaço, o pH aumentou a partir de 48 h de cultivo atingindo valores próximos de 9,0 em 120 h para as concentrações 0%, 1% e 2%, fato este não observado quando utilizou-se a concentração de 3% (Figura 9E).

Para o soro do leite (Figura 9F), o pH se manteve crescente em todas as concentrações utilizadas até o tempo de 120 h, sendo observadas variações entre 9,4 e 9,6.

Com base nos valores de pH obtidos, percebeu-se uma acentuada queda do pH no meio de cultivo, quando utilizou-se sacarose e glicose, como fontes de carbono. Para as demais fontes utilizadas foi verificado um expressivo aumento nos valores de pH.

Koller et al. (2008) verificaram que, quando o micro-organismo foi cultivado em meio sintético com açúcares puros, um alto decréscimo do valor do pH foi observado.

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

Philip et al. (2009) investigaram a influência do pH do meio de cultura na produção de PHB. Para testar a influência do pH, os autores realizaram experimentos com controle de pH nos valores de 3,0; 6,8 e 10,0. O cultivo que apresentou maior produção foi com pH controlado em 6,8, atingindo 23% de PHB em 25 h de cultivo, com posterior consumo de polímero. Nos experimentos em controle de pH, o pH caiu para um valor de 4,5 e não houve degradação do polímero produzido. Segundo os autores, isto é possivelmente devido ao fato de que a degradação do PHB leva à produção de 3-hidroxi-butanato, um ácido, portanto, em condições de baixo pH a degradação do polímero é inibida. A queda do pH ocorre, possivelmente devido à produção de ácido acético e ácido pirúvico. Os autores sugerem que o baixo valor de pH inibe a degradação interna do PHB.

No presente trabalho foi observado o aumento do pH nos meios com as fontes de carbono lactose, glicerol, melão e soro de leite. Juntamente com o aumento do pH houve a queda na concentração de polímero no meio. Este decréscimo na concentração do polímero pode ser justificado pelo consumo intracelular deste polímero a partir de 48 h, levando a níveis baixos de acúmulo do mesmo.

Uma vez verificado que o pH mais baixo favorece a acumulação do PHB, seria interessante em novos testes, fazer o controle do pH ao longo do cultivo, mantendo seus valores mais baixos.

5.2 EFEITO DO pH INICIAL DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE PHB

Para a avaliação das produções de PHB sob condição de temperatura de 30°C com variações no pH do meio de cultivo foram selecionadas as maiores produções obtidas, de acordo com as concentrações utilizadas (1%, 2% e 3%), o tempo de cultivo (horas) e as fontes de carbono testadas (glicose, sacarose, lactose, glicerol, melação e soro de leite). Para as fontes de carbono glicose e sacarose foi selecionada a concentração de 1% e para as fontes lactose, glicerol, melação e soro de leite, a concentração selecionada foi de 2%. O tempo de cultivo adotado foi de 48 h, devido todas as fontes de carbono apresentar maior produção de PHB. A partir daí, procedeu-se as avaliações em condição de temperatura a 30°C, onde se promoveu a variação do pH em 5,0, 6,0, 6,5, 7,0 e 8,0. Nestas condições foram avaliados o peso seco celular (PSC), a produção de PHB e a produtividade de PHB em relação ao PSC (Tabela 1).

Tabela 1. Produção de PHB (g/L) e produtividade em relação ao PSC (%), quando cultivado em meio DYG's acrescido de glicose 1%, sacarose 1%, lactose 2%, glicerol 2%, melação 2% e soro de leite 2%. Cultivo realizado em 48 h, a 30°C, 150 rpm e pH de 5,0; 6,0; 6,5; 7,0 e 8,0.

pH	5,0		6,0		6,5*		7,0		8,0	
	PHB	%								
Glicose 1%	0,12±0,02	17,29	0,27±0,04	25,70	0,32±0,02	24,03	0,17±0,02	17,77	0,29±0,02	22,71
Sacarose 1%	0,44±0,02	46,52	0,78±0,03	54,16	0,57±0,06	52,61	0,61±0,03	51,67	0,83±0,03	52,74
Lactose 2%	0,26±0,04	22,15	0,62±0,04	44,31	0,58±0,03	42,42	0,42±0,04	35,55	0,67±0,04	42,52
Glicerol 2%	0,50±0,04	43,56	0,94±0,04	47,48	0,92±0,02	45,09	0,75±0,08	40,97	0,98±0,22	47,88
Melação 2%	0,38±0,05	22,41	0,74±0,04	36,30	0,73±0,11	33,57	0,60±0,02	29,77	0,82±0,12	35,78
Soro 2%	0,13±0,02	18,88	0,40±0,01	34,65	0,40±0,04	33,11	0,31±0,04	27,69	0,46±0,04	34,56

*pH 6,5 (Tratamento testemunha). Experimentos realizados na primeira etapa. Os valores são as médias de três repetições e o desvio padrão.

Analisando os resultados obtidos de PSC para todas as fontes de carbono testadas, em condições de pH 5,0 e pH 7,0, verificou-se valores abaixo daquele obtido para o pH 6,5 (testemunha). Em condições de pH 6,0 e pH 8,0, todas as fontes de carbono proporcionaram valores superiores de PSC aquele encontrado em condição de pH 6,5 (Tabela 1).

Em estudo realizado por Valappil et al. (2007) testando a influência do pH na produção de PHB por *Bacillus cereus*, obtiveram a maior produção de PHB quando o pH atingiu 4,5, que segundo os autores, está relacionado ao não consumo de polímero. Kominek e Halvorson (1965) encontraram resultados e verificaram que quando o meio de cultivo foi mantido num valor mais alto de pH, a produção de PHB não foi favorecida enquanto que num pH mais baixo, o consumo do polímero não ocorreu, mantendo o acúmulo de PHB intracelular.

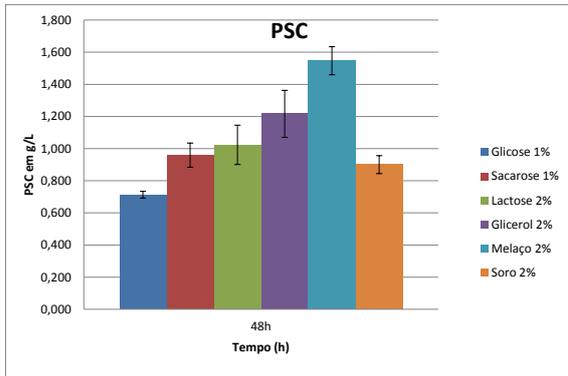
Ao analisar a produção de PHB em relação ao PSC, considerando o desvio padrão aplicado às médias das triplicatas, considerou-se que os resultados obtidos de produção de PHB para o pH 6,0 e 8,0 são os maiores e bem parecidos entre si e próximos a pH 6,5.

Os resultados obtidos para o pH são diferentes daqueles observados na literatura para a produção de PHB a partir de outros micro-organismos. Enquanto na literatura, as maiores taxas de acumulação de PHB ocorrem com pH em torno de 4,5, no presente estudo as maiores taxas de acumulação de PHB ocorreram com pH 6,0 e 8,0. Não foi encontrado na literatura nenhum dado que explique essa diferença. O metabolismo da *Bradyrhizobium japonicum* parece diferir das demais bactérias no que diz respeito à acumulação de PHB em razão do pH. Um estudo feito por Mercan et al. (2002) evidencia a produção de PHB (0,06 g/L em 48 h) por *Bradyrhizobium japonicum* em pH 7,0, porém não apresenta dados da variação do pH ao longo do tempo.

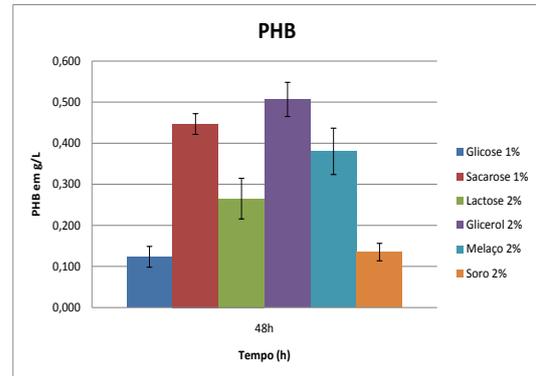
Entre os valores de pH 6,0 e 8,0 o pH 6,0 foi selecionado para a realização de novos testes com variação de temperatura, uma vez que *Bradyrhizobium japonicum* tem uma tendência a se desenvolver melhor em pH mais baixo e tem seu crescimento geralmente inibido a partir de pH 9,0 (JORDAN, 1982).

A seguir serão apresentados gráficos que mostram resultados do peso seco celular, produção de PHB, variação de pH e produtividade das diferentes fontes de carbono, em temperatura de 30°C até 48 horas de cultivo (Figuras 10, 11, 12 e 13).

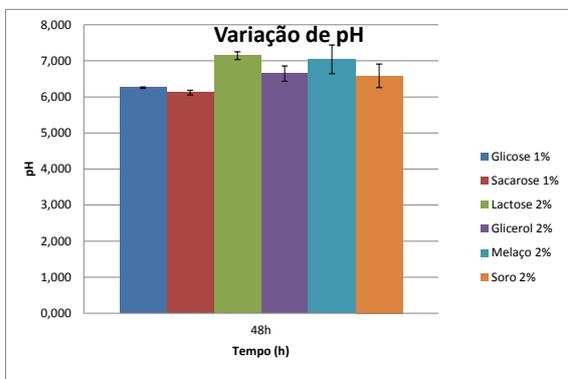
(A)



(B)



(C)



(D)

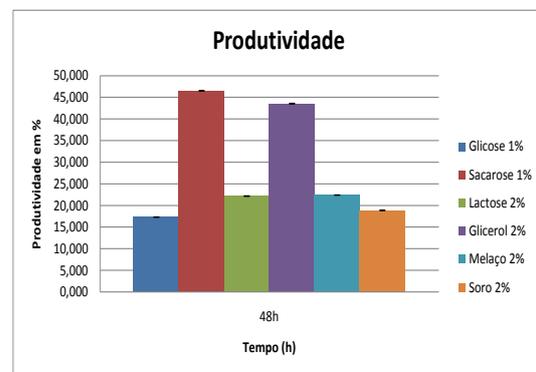
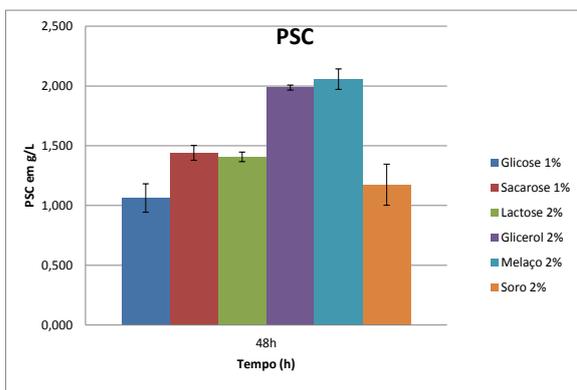
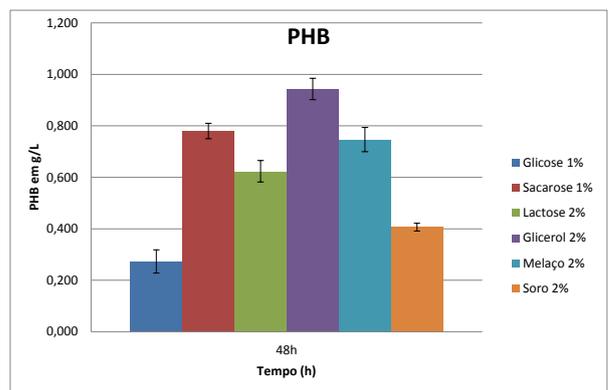


Figura 10. Crescimento de *Bradyrhizobium japonicum* (A), produção de PHB (B), variação de pH (C) e produtividade de PHB em relação ao PSC (D), quando cultivado em meio DYG's. Cultivo realizado a 30°C, 150 rpm e pH 5,0.

(A)



(B)



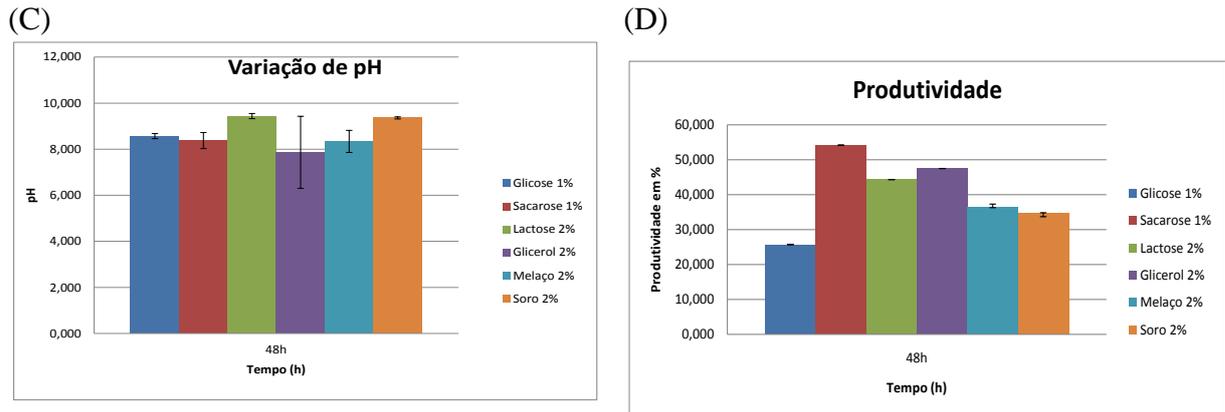


Figura 11. Crescimento de *Bradyrhizobium japonicum* (A), produção de PHB (B), variação de pH (C) e produtividade de PHB em relação ao PSC (D), quando cultivado em meio DYG's. Cultivo realizado a 30°C, 150 rpm e pH 6,0.

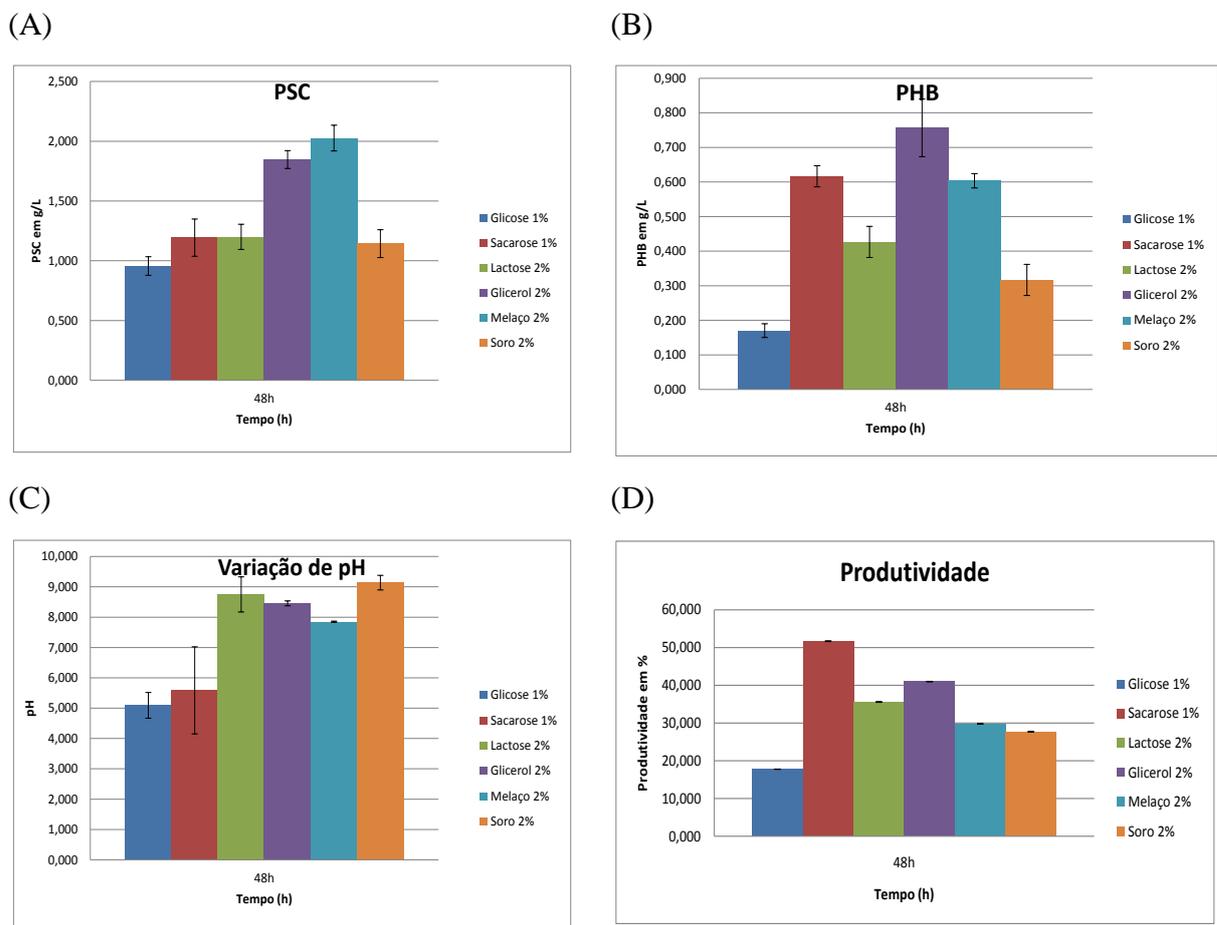
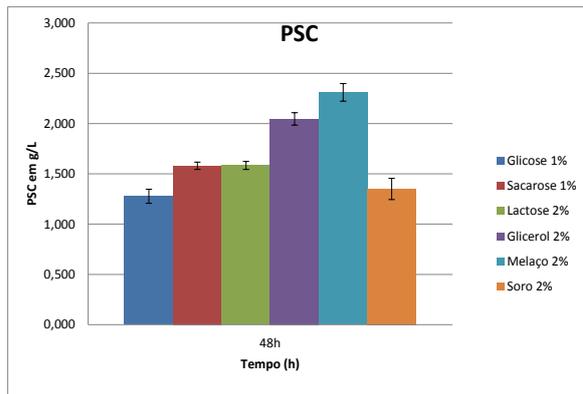
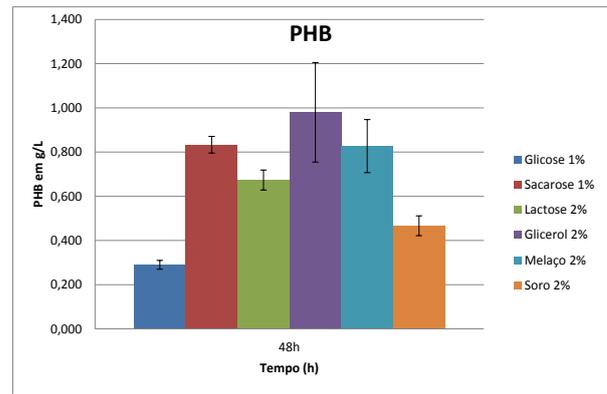


Figura 12. Crescimento de *Bradyrhizobium japonicum* (A), produção de PHB (B), variação de pH (C) e produtividade de PHB em relação ao PSC (D), quando cultivado em meio DYG's. Cultivo realizado a 30°C, 150 rpm e pH 7,0.

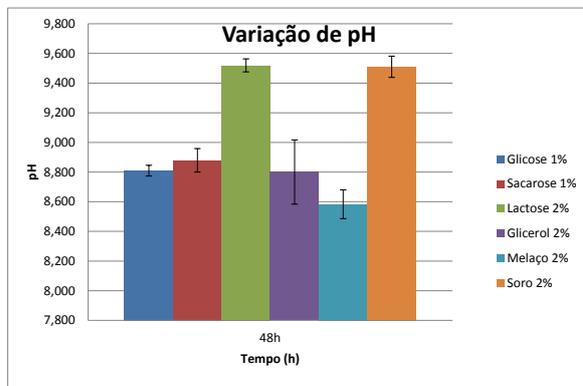
(A)



(B)



(C)



(D)

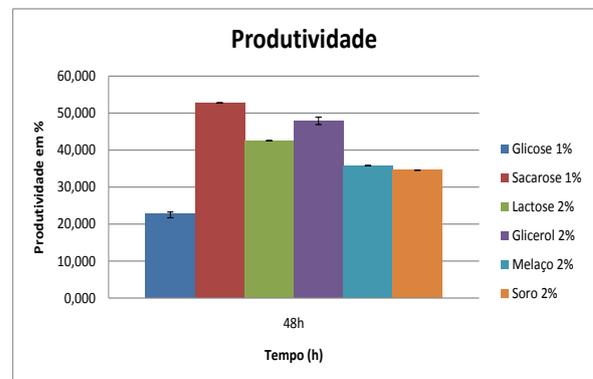


Figura 13. Crescimento de *Bradyrhizobium japonicum* (A), produção de PHB (B), variação de pH (C) e produtividade de PHB em relação ao PSC (D), quando cultivado em meio DYG's. Cultivo realizado a 30°C, 150 rpm e pH 8,0.

5.3 EFEITO DA TEMPERATURA DE CRESCIMENTO SOBRE A PRODUÇÃO DE PHB

Nas condições de temperatura em 30°C e variações de pH, observou-se melhores resultados na produção de PHB em condições de pH 6,0 e 8,0. Conforme mencionado anteriormente, pelo pH 6,0 ser considerado melhor para o desenvolvimento da bactéria estudada, ele foi selecionado para a realização das análises considerando as variações para condição de temperatura. Os testes foram realizados com pH 6,0 e temperaturas de 25°C e 35°C e comparados àqueles resultados obtidos inicialmente com temperatura de 30°C.

Analisando os resultados para a produção de PHB e a produtividade de PHB obtidos em relação ao PSC, verificou-se que para glicose, lactose, glicerol e melaço, os resultados foram semelhantes entre as temperaturas de 30°C e 35°C. Para as fontes de carbono sacarose e

soro de leite, os melhores resultados observados na produção de PHB ocorreram com temperatura de 35°C (Tabela 2).

Jordan (1982) realizou estudos de caracterização da bactéria *Bradyrhizobium japonicum* e dentre outras características, afirmou que a melhor temperatura para o crescimento de *B. japonicum* foi a 30°C. Mercan et al. (2002), também obtiveram melhores resultados para a mesma bactéria na produção de PHB com temperatura em torno de 30°C. Em um estudo realizado por Figueiredo et al. (2014) a espécie *Cupriavidus necator* produziu maiores quantidades de PHB quando cultivadas à temperatura de 35°C, quando comparada ao cultivo em condições de temperatura de 30°C. De acordo com esses dados, e verificando que as diferenças na produção de PHB não foram muito grandes no presente trabalho, pode-se dizer, que nesse caso, não houve diferença em se usar a temperatura de 30°C ou de 35°C.

Desta forma, para a realização das análises de custo, optou-se por usar os maiores valores absolutos de produção de PHB: glicose (0,28 g/L), sacarose (0,81 g/L), lactose (0,62 g/L), glicerol (0,97 g/L), melão (0,77 g/L) e soro de leite (0,44 g/L).

Na tabela 2, estão evidenciados os resultados da produção de PHB e da produtividade em relação ao PSC, nas 3 temperaturas testadas (25°C, 30°C e 35°C).

Tabela 2. Produção de PHB (g/L) e produtividade em relação ao PSC (%), quando cultivado em meio DYG's acrescido de glicose 1%, sacarose 1%, lactose 2%, glicerol 2%, melão 2% e soro de leite 2%. Cultivo realizado em 48 h, pH 6,0, 150 rpm e temperatura de 25°C, 30°C e 35°C.

Temperatura	25°C		30°C*		35°C	
	PHB	%	PHB	%	PHB	%
Glicose 1%	0,16±0,01	17,97	0,27±0,04	25,70	0,28±0,01	19,40
Sacarose 1%	0,25±0,06	28,46	0,78±0,03	54,16	0,81±0,02	49,09
Lactose 2%	0,23±0,01	35,17	0,62±0,04	44,31	0,61±0,04	39,03
Glicerol 2%	0,46±0,03	42,50	0,94±0,04	47,48	0,97±0,02	45,20
Melão 2%	0,49±0,02	46,83	0,74±0,04	36,30	0,77±0,04	34,37
Soro de leite 2%	0,22±0,03	38,28	0,40±0,01	34,65	0,44±0,01	34,92

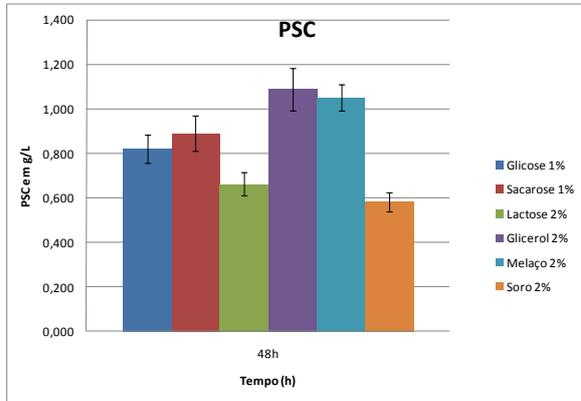
*T = 30°C (Tratamento testemunha)

Observou-se um aumento dos valores de pH no cultivo dos micro-organismos, quando analisados os resultados obtidos para PSC, PHB, variação de pH e produtividade de PHB em relação ao PSC em condições de pH 6,0 para as diferentes fontes de carbono testadas em condições de temperatura de 25°C (Figura 14) e 35°C (Figura 15).

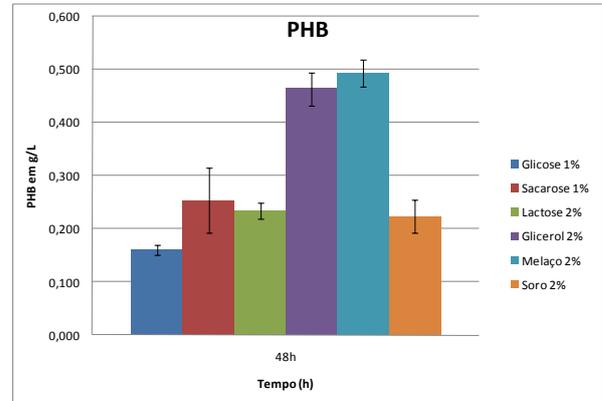
Os gráficos apresentam os resultados do crescimento bacteriano medido pelo PSC, da produção de PHB, da produtividade de PHB em relação ao PSC em condições de pH 6,0, para

as diferentes fontes de carbono testadas em condições de temperatura 25°C (Figura 14) e 35°C (Figura 15). Os resultados para a temperatura de 30°C encontram-se nas Figuras de 3 a 8.

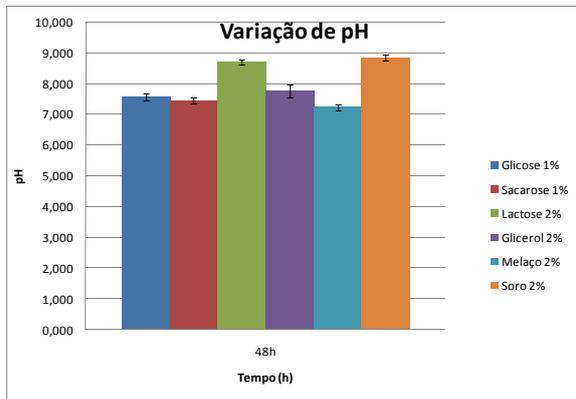
(A)



(B)



(C)



(D)

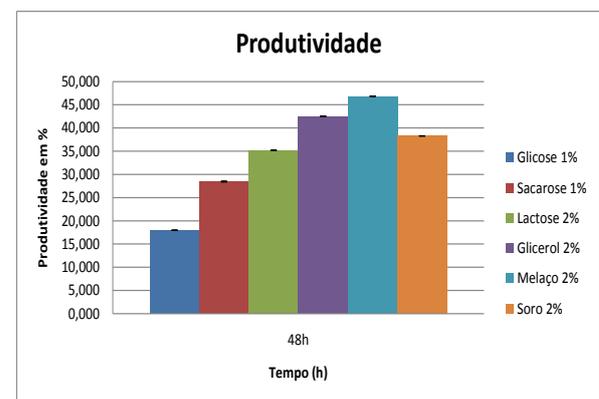
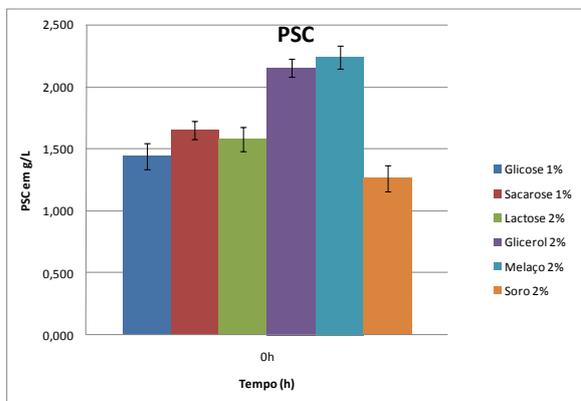
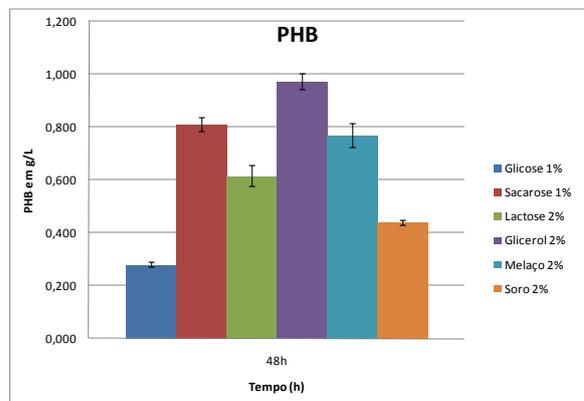


Figura 14. Crescimento de *Bradyrhizobium japonicum* (A), produção de PHB (B), variação de pH (C) e produtividade de PHB em relação ao PSC (D), quando cultivado em meio DYG's. Cultivo realizado a 25°C, 150 rpm e pH 6,0.

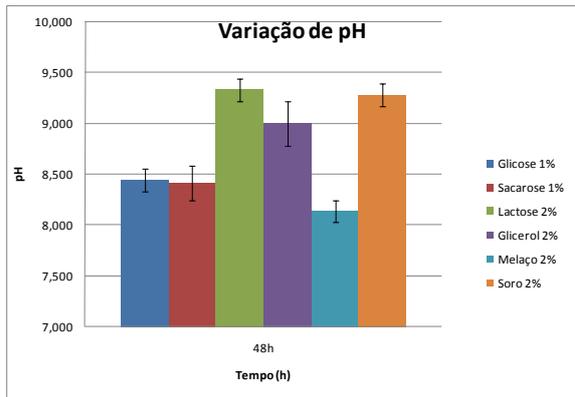
(A)



(B)



(C)



(D)

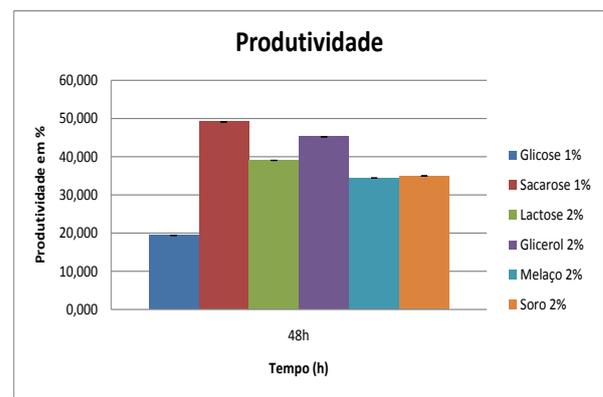


Figura 15. Crescimento de *Bradyrhizobium japonicum* (A), produção de PHB (B), variação de pH (C) e produtividade de PHB em relação ao PSC (D), quando cultivado em meio DYG's. Cultivo realizado a 35°C, 150 rpm e pH 6,0.

5.4 CUSTO DE PRODUÇÃO DE PHB

Na análise de custo de produção dos bioplásticos produzidos em laboratório foi avaliado o custo operacional envolvido em cada experimentação, considerando as diferentes fontes de carbono. Os custos operacionais foram determinados considerando os componentes necessários para o preparo do meio de cultura, os reagentes utilizados e a fonte de carbono (Tabela 3). Na condição de laboratório os itens componentes do custo operacional que foram utilizados apresentaram alto valor na cotação de mercado, por se tratarem de insumos que apresentaram alto grau de pureza. Em escala industrial, os custos de aquisição desses insumos tendem a reduzir, quando adquiridos em maiores quantidades. Diante disso, a discussão dos resultados será realizada considerando não o valor absoluto encontrado e sim a análise comparativa dos dados. A fonte de carbono sacarose foi considerada o tratamento testemunha, por se tratar de uma fonte utilizada em escala industrial para a produção de bioplásticos.

Todas as fontes de carbono analisadas apresentaram valores maiores que aquele obtido para a sacarose (Tabela 3). As fontes glicose e lactose apresentaram os custos operacionais maiores por se tratarem de fontes de carbono consideradas puras.

Tabela 3. Custo operacional, em reais, da produção em gramas de PHB, em laboratório

Fonte de carbono	Sacarose	Glicose	Lactose	Glicerol	Melaço	Soro
	R\$ 0,31	R\$ 1,90	R\$ 3,01	R\$ 1,33	R\$ 0,66	R\$ 0,00
Meio de cultura						
Hidróxido de potássio	R\$ 0,01	R\$ 0,03	R\$ 0,01	R\$ 0,01	R\$ 0,01	R\$ 0,02
Ácido málico	R\$ 0,27	R\$ 0,77	R\$ 0,35	R\$ 0,22	R\$ 0,28	R\$ 0,49
Peptona	R\$ 0,38	R\$ 1,10	R\$ 0,50	R\$ 0,32	R\$ 0,40	R\$ 0,70
Extrato de levedura	R\$ 1,21	R\$ 3,49	R\$ 1,58	R\$ 1,01	R\$ 1,27	R\$ 2,22
Fosfato de potássio	R\$ 0,03	R\$ 0,08	R\$ 0,04	R\$ 0,02	R\$ 0,03	R\$ 0,05
Sulfato de magnésio	R\$ 0,09	R\$ 0,25	R\$ 0,11	R\$ 0,07	R\$ 0,09	R\$ 0,16
Ácido glutâmico	R\$ 0,20	R\$ 0,58	R\$ 0,26	R\$ 0,17	R\$ 0,21	R\$ 0,37
Ágar bacteriológico	R\$ 0,34	R\$ 0,98	R\$ 0,44	R\$ 0,28	R\$ 0,36	R\$ 0,62
Colônia	R\$ 0,00					
Reagentes químicos						
Hipoclorito de sódio	R\$ 0,01	R\$ 0,03	R\$ 0,01	R\$ 0,01	R\$ 0,01	R\$ 0,02
Acetona	R\$ 0,02	R\$ 0,06	R\$ 0,03	R\$ 0,02	R\$ 0,02	R\$ 0,04
Clorofórmio	R\$ 0,01	R\$ 0,03	R\$ 0,01	R\$ 0,01	R\$ 0,01	R\$ 0,02
Ácido clorídrico	-	-	-	-	-	R\$ 0,02
Custo operacional						
Total	R\$ 2,86	R\$ 9,29	R\$ 6,35	R\$ 3,46	R\$ 3,35	R\$ 4,73

US\$ 1.00 = R\$ 2,99. Cotação média do dólar realizada para o mês de abril do ano de 2015 (Banco Central do Brasil, 2015)

Ao comparar os custos operacionais da produção de PHB obtidos com as fontes glicose e lactose com aqueles obtidos utilizando os resíduos agroindustriais (glicerol, melaço e soro) como fonte de carbono, verificou-se que estes foram superiores aos encontrados quando se utilizou o carbono proveniente dos resíduos agroindustriais.

Dentre as fontes de carbono derivadas dos resíduos agroindustriais, o melaço foi aquele que apresentou o menor custo operacional de produção. Trabalhos realizados por Lee et al. (1995), Rehm (2003) e Shen et al. (2009) relataram que para reduzir os custos envolvidos na produção de PHB faz-se necessário o uso de fontes renováveis mais baratas.

De acordo com Choi e Lee (1997) os preços da matéria prima são os componentes do custo de produção do bioplástico, incluindo a fonte de carbono, que mais contribuem para os altos custos da produção de PHB. Os dados encontrados na composição de custos (Tabela 4) corroboram com essa assertiva.

Ao analisar a composição do custo operacional, verificou-se que a maior representação percentual foi com aqueles componentes envolvidos no preparo do meio de cultura (Tabela 4).

Tabela 4. Composição do custo operacional, em %, da produção em gramas de PHB, em laboratório

Fonte de carbono	Sacarose	Glicose	Lactose	Glicerol	Melaço	Soro
	10,72	20,40	47,38	38,37	19,72	0,10
Subtotal	10,72	20,40	47,38	38,37	19,72	0,10
Meio de cultura						
Hidróxido de potássio	0,33	0,30	0,20	0,23	0,30	0,37
Ácido málico	9,34	8,33	5,51	6,45	8,40	10,42
Peptona	13,26	11,82	7,82	9,15	11,92	14,79
Extrato de levedura	42,11	37,55	24,82	29,07	37,87	46,96
Fosfato de potássio	0,95	0,84	0,56	0,65	0,85	1,06
Sulfato de magnésio	3,07	2,74	1,81	2,12	2,76	3,42
Ácido glutâmico	6,97	6,21	4,11	4,81	6,27	7,77
Ágar bacteriológico	11,84	10,55	6,98	8,17	10,65	13,20
Colônia	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Subtotal	87,87	78,35	51,79	60,66	79,02	97,99
Reagentes químicos						
Hipoclorito de sódio	0,33	0,29	0,19	0,23	0,29	0,37
Acetona	0,73	0,66	0,43	0,51	0,66	0,82
Clorofórmio	0,34	0,31	0,20	0,24	0,31	0,38
Ácido clorídrico	-	-	-	-	-	0,35
Subtotal	1,41	1,25	0,83	0,97	1,26	1,92
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Dos itens que compõem a produção de PHB, notou-se que o extrato de levedura utilizado na preparação do meio de cultura foi o item mais expressivo na composição dos custos. A presença desse item elevou o custo da produção do PHB.

As fontes de carbono, lactose e glicerol, representaram 47,38% e 38,37%, respectivamente, do custo de produção do PHB. Com uso de fonte de carbono proveniente de resíduos agroindustriais adquiridos sem o custo da aquisição pode-se obter redução no custo de produção, melhorando o preço final do bioplástico.

Como os principais componentes do custo operacional foram àqueles relacionados ao meio de cultura, sugerem-se estudos que utilizem outros meios de cultura para produção do bioplástico, reduzindo o custo operacional da produção de PHB. Dentre aqueles meio de cultura disponíveis, o meio mineral pode ser utilizado e analisado. Este meio deve conter no mínimo (g/L): Na_2HPO_4 6,7; NH_4Cl 0,1; KH_2PO_4 1,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2; CaCl 0,01; Citrato de amônio ferroso 0,06; biotina e 1 mL de elementos traços (Ramsay et al., 1990).

Considerando que a fonte de carbono derivada de resíduos agroindustriais poderia ser doada, por se tratar de um subproduto da atividade agroindustrial, certamente haveria redução no custo operacional do bioplástico produzido. Nesta condição, observaram-se resultados

atrativos para o uso de fontes de resíduos agroindustriais na produção de bioplástico (Tabela 5).

Tabela 5. Custo operacional, em reais, da produção em gramas de PHB em laboratório, considerando a doação da fonte de carbono proveniente do resíduo agroindustrial

Fonte de carbono	Sacarose	Glicose	Lactose	Glicerol	Melaço	Soro
	R\$ 0,31	R\$ 1,90	R\$ 3,01	R\$ 0,00	R\$ 0,00	R\$ 0,00
Meio de cultura						
Hidróxido de potássio	R\$ 0,01	R\$ 0,03	R\$ 0,01	R\$ 0,01	R\$ 0,01	R\$ 0,02
Ácido málico	R\$ 0,27	R\$ 0,77	R\$ 0,35	R\$ 0,22	R\$ 0,28	R\$ 0,49
Peptona	R\$ 0,38	R\$ 1,10	R\$ 0,50	R\$ 0,32	R\$ 0,40	R\$ 0,70
Extrato de levedura	R\$ 1,21	R\$ 3,49	R\$ 1,58	R\$ 1,01	R\$ 1,27	R\$ 2,22
Fosfato de potássio	R\$ 0,03	R\$ 0,08	R\$ 0,04	R\$ 0,02	R\$ 0,03	R\$ 0,05
Sulfato de magnésio	R\$ 0,09	R\$ 0,25	R\$ 0,11	R\$ 0,07	R\$ 0,09	R\$ 0,16
Ácido glutâmico	R\$ 0,20	R\$ 0,58	R\$ 0,26	R\$ 0,17	R\$ 0,21	R\$ 0,37
Ágar bacteriológico	R\$ 0,34	R\$ 0,98	R\$ 0,44	R\$ 0,28	R\$ 0,36	R\$ 0,62
Colônia	R\$ 0,00					
Reagentes químicos						
Hipoclorito de sódio	R\$ 0,01	R\$ 0,03	R\$ 0,01	R\$ 0,01	R\$ 0,01	R\$ 0,02
Acetona	R\$ 0,02	R\$ 0,06	R\$ 0,03	R\$ 0,02	R\$ 0,02	R\$ 0,04
Clorofórmio	R\$ 0,01	R\$ 0,03	R\$ 0,01	R\$ 0,01	R\$ 0,01	R\$ 0,02
Ácido clorídrico	-	-	-	-	-	R\$ 0,02
Custo operacional efetivo						
Total	R\$ 2,86	R\$ 9,29	R\$ 6,35	R\$ 2,14	R\$ 2,69	R\$ 4,72

US\$ 1.00 = R\$ 2,99. Cotação média do dólar realizada para o mês de abril do ano de 2015 (Banco Central do Brasil, 2015)

Analisando os resultados obtidos do custo operacional, levando em consideração a doação das fontes de carbono (glicerol, melaço e soro de leite) provenientes do processo agroindustrial, verificou-se redução nos custos envolvidos quando se produz bioplástico a partir do uso de glicerol e melaço.

O custo operacional utilizando o glicerol como fonte de carbono passou de R\$ 3,46 (Tabela 1) para R\$ 2,14 (Tabela 3). Além de ter seu custo reduzido, quando a fonte de carbono foi doada, esse passou ainda ser menor do que os custos obtidos com a sacarose (tratamento testemunha) sendo atrativo para o investidor adotar o uso de fonte de carbono provenientes de resíduos agroindustriais, desde que a obtenção desta fonte apresente custo zero, ou seja, a fonte não apresente custo de aquisição, junto a agroindústria. Além disso, promove-se a redução do impacto ambiental quando se usa resíduos e dá-se o destino correto ambientalmente. Situação semelhante ocorreu para o uso do melaço, que apresentou redução no custo operacional, passando de R\$ 3,35 para R\$ 2,69.

Analisando a composição do custo operacional, considerando a doação das fontes de carbono oriundas dos resíduos agroindustriais, observou-se que o meio de cultura apresentou maior participação nos custos de produção dos bioplásticos (Tabela 6). Dentre os itens necessários para o preparo do meio de cultura, o extrato de levedura foi aquele que teve maior representatividade, situação semelhante quando considerado os custos com aquisição das fontes de carbono.

Tabela 6. Composição do custo operacional, em %, da produção em gramas de PHB em laboratório, considerando a doação da fonte de carbono proveniente do resíduo agroindustrial

Fonte de carbono	Sacarose	Glicose	Lactose	Glicerol	Melaço	Soro
	10,72	20,40	47,38	0,00	0,00	0,00
Subtotal	10,72	20,40	47,38	0,00	0,00	0,00
Meio de cultura						
Hidróxido de potássio	0,33	0,30	0,20	0,37	0,37	0,37
Ácido málico	9,34	8,33	5,51	10,46	10,46	10,43
Peptona	13,26	11,82	7,82	14,85	14,85	14,80
Extrato de levedura	42,11	37,55	24,82	47,17	47,17	47,00
Fosfato de potássio	0,95	0,84	0,56	1,06	1,06	1,06
Sulfato de magnésio	3,07	2,74	1,81	3,44	3,44	3,43
Ácido glutâmico	6,97	6,21	4,11	7,81	7,81	7,78
Ágar bacteriológico	11,84	10,55	6,98	13,26	13,26	13,21
Colônia	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Subtotal	87,87	78,35	51,79	98,43	98,43	98,08
Reagentes químicos						
Hipoclorito de sódio	0,33	0,29	0,19	0,37	0,37	0,37
Acetona	0,73	0,66	0,43	0,82	0,82	0,82
Clorofórmio	0,34	0,31	0,20	0,38	0,38	0,38
Ácido clorídrico	-	-	-	-	-	0,35
Subtotal	1,41	1,25	0,83	1,57	1,57	1,92
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Analisando a composição do custo operacional envolvido na produção de PHB, sem despesa na aquisição da fonte de carbono (Tabela 6), o extrato de levedura apresentou maior representatividade, oscilando entre 24,82% e 47,17%.

Nesta condição experimental, em que se considerou não haver custo com a compra das fontes de carbono provenientes da agroindústria, a sacarose, a glicose e a lactose apresentaram representatividade na composição dos custos operacionais com 10,72%, 20,40% e 47,38%, respectivamente. Visando compreender os resultados obtidos na determinação dos custos de produção e promover uma análise comparativa promoveu-se a determinação da relação entre as fontes de carbono analisadas com a sacarose, fonte de carbono considerada tratamento

testemunha, nas duas condições de estudo, com a compra da fonte de carbono e com a doação da fonte de carbono proveniente dos resíduos agroindustriais (Tabela 7).

A sacarose considerada o tratamento testemunha teve a sua relação mantida como base em 100% e, a partir daí, comparou-se as demais fontes em termos percentuais quando seria a participação de cada uma.

Tabela 7. Resultados da análise econômica comparativa do custo operacional, em reais, e a relação, em %, da produção em gramas de PHB em laboratório das fontes de carbono com a sacarose

Fonte de carbono	Com a compra da fonte de carbono		Sem a compra da fonte de carbono*	
	Custo operacional	Relação	Custo operacional	Relação
Sacarose	R\$ 2,86	100,00%	R\$ 2,86	100,00%
Glicose	R\$ 9,29	324,82%	R\$ 9,29	324,82%
Lactose	R\$ 6,35	222,02%	R\$ 6,35	222,02%
Glicerol	R\$ 3,46	120,97%	R\$ 2,14	74,82%
Melaço	R\$ 3,35	117,13%	R\$ 2,69	94,04%
Soro de leite	R\$ 4,73	165,38%	R\$ 4,72	165,03%

*Considerando a doação da fonte de carbono quando esta foi proveniente da produção de resíduos agroindustriais

Considerando a compra da fonte de carbono, a relação percentual dos custos envolvidos para produção de PHB foi superior aquele obtido com a sacarose. Dentre as fontes de carbono analisadas, o melaço e o glicerol foram aqueles que apresentaram menores percentuais entre as fontes de carbono testadas, representando 117,13% e 120,97%, respectivamente, em relação a sacarose.

Na condição em que foi considerada a doação da fonte de carbono proveniente do processo agroindustrial, ou seja, não houve despesa na aquisição da fonte de carbono, observou-se que as fontes, glicerol e melaço apresentaram um percentual de custo operacional inferior aquele obtido com a sacarose (tratamento testemunha). Este fato evidenciou que o uso de resíduos agroindustriais utilizados na produção de PHB promoveu a redução do custo operacional.

Ressalta-se que os resultados econômicos foram obtidos por meio dos custos levantados em condição laboratorial e que os valores absolutos não refletem os valores encontrados quando a produção de PHB ocorre em escala industrial. Desta forma, salienta-se

que a análise dos resultados deve ser realizada comparativamente, quando se discute os custos operacionais observados na produção de PHB, a partir de resíduos agroindustriais como fonte de carbono.

Sugere-se também, que na dificuldade da doação de determinados resíduos, como é o caso do glicerol, uma vez que o mesmo pode ser utilizado em indústrias farmacêuticas e de cosméticos, o ideal é ter na mesma planta empresas produtoras de biodiesel e de PHB, assim o resíduo poderia ser totalmente aproveitado sem representar custo para a produção de PHB.

6- CONCLUSÃO

Os micro-organismos pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium japonicum* apresentam potencial para a produção de PHB.

As condições de cultivo para o desenvolvimento dos micro-organismos *Bradyrhizobium japonicum* obter a maior produção de PHB é utilizando meio contendo pH igual a 6,0, em temperatura controlada de 30°C ou 35°C, pelo período de 48 horas.

A concentração utilizada de cada fonte de carbono é de 1% para sacarose e glicose e de 2% para lactose, glicerol, melaço e soro de leite.

A maior produção de PHB obtida em meio DYG's ocorre com o uso de glicerol como fonte de carbono.

O extrato de levedura é o item de maior representatividade no custo operacional de produção do PHB, independente da compra ou não da fonte de carbono.

A sacarose é a fonte de carbono que apresenta o menor custo operacional, na condição em que se compram todos os insumos necessários para a produção do PHB.

O glicerol e o melaço são fontes de carbono que apresentam menor custo operacional de produção, quando não necessitam de dispêndio financeiro para aquisição.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, L.L. Desenvolvimento de estratégias para aumentar a produtividade e controlar as propriedades de biopolímeros (PHAs) produzidas por culturas mistas. Dissertação de mestrado em Engenharia Química e Bioquímica da Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2010.
- AHN, W.S.; PARK, S.J.; LEE, S.Y. Production of Poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3624-3627, 2000.
- ANDERSON A.J.; DAWES, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev.*, 54: 450-472, 1990.
- ANDRADE, C.T.; COUTINHO, F.M.B.; DIAS, M.L.; LUCAS, E.F., OLIVEIRA, C.M.F.; TABAK, D. Dicionário de Polímeros. Rio de Janeiro: Interciência, 2001.
- ASENJO, J.A.; SCHMIDT, A.; ANDERSEN, P.; ANDREWS, B. Effect of single nutrient limitation on Poly- β -Hydroxybutyrate molecular weight distribution in *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 46: 497-502, 1995.
- ATHANASIADIS, I.; BOSKOU, D.; KANELLAKI, M.; KIOSSEOGLU, V.; KOUTINAS, A.A. Whey liquid waste of the dairy industry as raw material for potable alcohol production by kefir granules. *J. Agric. Food. Chem.*, 50: 7231-7234, 2002.
- AVELLA, M.; MARTUSCELLI, E. Poly-d-(3-hidroxybutyrate)/poly (ethylene oxide) blends: phase diagram, thermal and criystallization behavior. *Polymer*, 29: 1731-1737, 1988.
- AYORINDE, F.O.; SAEED, K.A.; PRICE, E.; MORROW, A.; COLLINS, W.E.; MCINNIS, F.; POLLACK, S.K.; ERIBO, B.E. Production of Poly(beta-hydroxybutyrate) from saponified *Vernonia galamensis* oil by *Alcaligenes eutrophus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 21: 46-50, 1998.
- BARHAM, P.J.; KELLER, A.; OTUN, E.L.; HOLMES, P.A. Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate. *Journal of Materials Science*, 19: 2781, 1984.
- BANCO CENTRAL DO BRASIL (BCB). Taxas de câmbio - Conversão de moedas. Disponível em: <<http://www4.bcb.gov.br/pec/conversao/conversao.asp>>, acessado em: 13/06/2015.
- BERLANGA, M.; MONTERO, M.T.; BORREL, J.F.; GUERRERO, R. Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate producing bacteria from microbial mats. *International Microbiology*, 9: 95-102, 2006.
- BIZARRO, M.J. Simbiose e variabilidade de estirpes de *Bradyrhizobium* associadas a cultura da soja em diferentes manejos de solo. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Santa Maria. Faculdade de Agronomia, 2008. 107p.

- BONARTSEVA, G.A.; MYSHKINA, V.L.; ZAGREBA, E.D. Poly-bhydroxybutyrate content in cells of various *Rhizobium* species during growth with different carbon and nitrogen sources. *Microbiology*, 63: 45-48, 1994.
- BOSCO, F.; CHIAMPO, F. Production of polyhydroxyalcanoates (PHAs) using milk whey and dairy wastewater activated sludge production of bioplastics using dairy residues. *Journal Bioscience Bioengineer*, 109: 418-421, 2010.
- BORSCHIVIER, S.; ALMEIDA, L.F.M.; ROITMANET, T. Monitoramento tecnológico e mercadológico de biopolímeros. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 18: 256-261, 2008.
- BRAUNEGG, G.; BONA R.; KOLLER, M. Sustainable polymer production. *Polymer Plastics Technology and Engineering*, 43: 1779-1793, 2004.
- BRAUNEGG, G.; BONA, R.; KOLLER, M.; WALLNER, E. Sustainable polymeric materials for renewable resources and agroindustrial wast. Expert group meeting on environmentally degradable plastics and sustainable development. Institute of Biotechnology, Graz University of Technology, Austria, 6p., 2002.
- BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K.F. *Journal of Biotechnology*, 65: 127, 1998.
- BRITO. G.F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E.M.; MÉLO, T.J.A. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. *Revista eletrônica de materiais e processos*, 6: 127-139, 2011.
- CESCA, K. Estudo da produção de poli-hidroxiálcanoatos *Escherichia coli* recombinante a partir de soro de queijo. Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.
- CHOI, J.I.; LEE, S.Y. Process analysis and economic evaluation for Poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Engineering*, 17: 335-342, 1997.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília: EMBRAPA-SPI: Itaguaí, 60: 11-35, 1995.
- DOYLE, V.; PEARSON, R. An investigation of the growth of human dermal fibroblasts on poly-L-lactic acid *in vitro*. *Journal of Materials Science*, 7: 381-385, 1996.
- FAVA, A.L.B. Clonagem e expressão do regulon scr em *Alcaligenes eutrophus* visando a produção de polihidroxibutirato a partir de sacarose. Dissertação (Mestrado) – Programa de Microbiologia, Universidade de São Paulo, 1997.
- FIGUEIREDO, T.V.B.; CAMPOS, M.I.; SOUSA, L.S.; SILVA, J.R.; DRUZIANA, J.I. Produção e caracterização de polihidroxiálcanoatos obtidos por fermentação da glicerina bruta residual do biodiesel. *Química Nova*, 37: 1111-1117, 2014.
- FILHO, S.O. O potencial da agroindústria canavieira do Brasil. FBT. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, p.7-9, 2003.
- FRANCHETTI, S.M.M.; MARCONATO, J.C. Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. *Quim. Nova*, 29: 811-816, 2006.

FRED, E.B.; BALDWIN, I.L.; MCCOY, E. Root nodule bacteria of leguminous plants. Madison: University of Wisconsin Press, 343 p. 1932.

FUNDAÇÃO GETÚLIO VARGAS (FGV) - Índice Geral de Preços - Disponibilidade Interna (IGP-DI). Disponível em: <<http://www.antigofgvdados.fgv.com.br>>, acessado em: 13/05/2015. Página mantida pela ©Copyright, 2015.

GOMEZ, J.G.C.; RODRIGUES, M.F.A.; ALLI, R.C.P.; TORRES, B.B.; BUENO N.C.L.; OLIVEIRA, M.S.; SILVA, L.F. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. Applied Microbiology and Biotechnology, 45: 785-791, 1996.

HÄNGGI, U.J. Requirements on bacterial polyesters as future substitute for conventional plastics for consumer goods. FEMS Microbiology Reviews, 16: 213-220, 1995.

HOLLIS, A.B.; KLOOS, W.E.; ELKAN, G.H. DNA: DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related Rhizobiaceae. Journal of General Microbiology, 123: 215-222, 1981.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STANLEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Bergey's manual of determinative bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, 9: 170p, 1994.

ILES, A.; MARTIN, N.A. Expanding bioplastics production: sustainable business innovation in the chemical industry. Journal of Cleaner Production, 45: 38-49, 2013.

IRIONDO, P.; IRUIN, J.J.; FERNANDEZ-BERRIDI, M.J. Association equilibria and miscibility prediction in blends of Poly(vinylphenol) with Poly(hydroxybutyrate) and related homo-and copolymers: an FTIR study. Macromolecules, 29: 5605, 1996.

JORDAN, D. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to Bradyrhizobium gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. International Journal of Systematic Bacteriology, 32: 136-139, 1982.

KAWAI, L.A. Melhoramento da eficiência de produção de polihidroxicanoatos por *Pseudomonas sp.* através da análise molecular e identificação genética. Dissertação de mestrado em Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2013.

KIM, B.S. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. Enzymes Microb Technol, 27: 774-777, 2000.

KIM, B.S.; LEES, Y.; CHANG, H.N.; production of poly- β -hydroxybutyrate by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. Biotechnology Letters, 14: 811-816, 1992.

KIM, B.S.; LEE, S.C.; CHANG, H.N.; WOO, S.J. Production of Poly(3-hydroxybutyric Acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. Biotechnology and Bioengineering, 43: 892-898, 1994.

KOLLER, M.; BONA, R.; BRAUNEGG, G.; HERMANN, C.; HORVAT, P.; KROUTIL, M.; MARTINZ, J.; NETO, J.; PEREIRA, L.; VARILA, P. Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. *Biomacromol.*, 6: 561-5, 2005.

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

KOMINEK, L.; HALVORSON, H.E. Metabolism of poly-beta-hydroxybutyrate and acetoin in *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*, 90: 1251-1259, 1965.

LEE, E.; KANG, S.; CHOI, C. Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) by newly isolated agrobacterium sp. SH-1 and GW-014 from structurally unrelated single carbon substrates. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79: 328-334, 1995.

LEE, S.Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*. 49:1-14. 1996.

LEE, S.Y., CHOI, J. Effect of fermentation performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. *Polym deg Stab*, 59:387-393, 1998.

LEE, S.Y.; CHOI, J.; HAN, K.; SONG, J.Y. Removal of endotoxin during purification of poly(3-Hydroxybutyrate) from gram-negative bacteria. *Appl. Environ Microbiol*, 65: 2762-2764, 1999.

LENZ, R.W.; MARCHESSAULT, R.H. Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromol.*, 6: 1-8, 2005.

LIU, F.; LI, W.; RIDGWAY, D.; GU, T.; SHEN, Z. Production of poly- β -hydroxybutyrate on molasses by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 20: 345-348, 1998.

LOPES, M.A.; CARVALHO, F.M. Custo de produção e análise de rentabilidade na pecuária leiteira. In: Simpósio Goiano Sobre Manejo E Nutrição De Bovinos, 3. Goiânia. Anais do Simpósio. Campinas: R.Vieira Gráfica & Editora Ltda. Cap. 11, p. 243-278, 2001.

LUENGO, J.M.; GARCÍA B.; SANDOVAL, A.; NAHARRO, G.; OLIVERA, E.R. Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*. 6:251-260, 2003.

MADISON, L.L.; HUISMAN, G.W. Engenharia metabólica de poli (3-hidroxiálcanoatos) a partir de ADN de plástico. *Microbiol Mol Biol*, 63:21-53, 1999.

MAINKA, C.P. Avaliação de diferentes tipos de substratos para produção de P(3HB) por *B. Megaterium*. Diplomação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

MARANGONI, C.; FURIGO, A.; ARAGÃO, G.M.F. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with acid propionic feeding. *Process Biochemistry*, 38: 137-141, 2002.

MATSUNAGA, M.; BEMELMANS, P.F.; TOLEDO, P.E.N.; DULLEY, R. D.; OKAWA, H.; PEDROSO, I.A. Metodologia de custo de produção utilizada pelo IEA. Boletim Técnico do Instituto de Economia Agrícola. São Paulo: IEA, 23: 123-139, 1976.

MERCAN, N.; ASLIM, B.; YUKSEKDAG, Z. N.; BEYATLI, Y. Production of Poly- β Hydroxybutyrate (PHB) by Some Rhizobium Bacteria. Turk Journal Biology, 26: 215-219, 2002.

MINAMISAWA, K. Division of rhizobitoxine-producing and hydrogen-uptake positive strains of *Bradyrhizobium japonicum* by nifDKE sequence divergence. Plant and Cell Physiology, 31: 81-89, 1990.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger: Princípios de Bioquímica. 3ª ed., São Paulo: SARVIER, 2002.

NIKEL, P.I.; ALMEIDA, A.; MELILLO, E.C.; GALVAGNO, M.A.; PETTINARI, M.J. New recombinant *Escherichia coli* strain tailored for the production of poly(3-hydroxybutyrate) from agroindustrial by-products. Applied and Environmental Microbiology, 72: 3949-3954, 2006.

NONATO, R.V.; MANTELLATO, P.E.; ROSSELL, C.E.V. Appl. Microbiol Biotechnology, 57: 1, 2001.

PACHEKOSKI, W.M.; AGNELLI, J.A.M.; ROSA, D.S. Blendas de polihidroxibutirato (PHB) com polipropileno (PP). Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 14, 2000.

PAGE, W.J. Bacterial polyhydroxyalkanoates, natural biodegradable plastics with a great future. Canadian Journal of Microbiology, 141: 1-3. 1995.

PARK, S.J.; PARK, J.P.; LEE, S.Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates rich in specific monomers. FEMS Microbiology Letters, 214: 217-222, 2002.

PHILIP, S.; SENGUPTA, S.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Effect of impeller speed and pH on the production of Poly(3-hydroxybutyrate) using *Bacillus cereus* SPV. Biomacromolecules, 10: 691-699, 2009.

PITT, F.D.; BOING, D.; BARROS, A.A.C. Desenvolvimento histórico, científico e tecnológico de polímeros sintéticos e de fontes renováveis. Revista da Unifebe, 9: 18p, 2011.

POIRIER, Y.; NAWRATH, C.; SOMERVILLE, C. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. Biotechnology, 13: 142-159, 2002.

POOMIPUK, N.; REUNGSANG, A.; PLANGKLANG, P. Poly- β -hydroxyalkanoates production from cassava starch hydrolysate by *Cupriavidus sp.* KKU38. International Journal of Biological 65: 51p, 2014.

- POSADA, J.A.; NARANJO, J.M. LÓPEZ, J.A.; HIGUITA, J.C.; CARDONA, C.A. Desing and analysis of poly-3-hydroxybutirate production processes form crude glycerol. *Process Biochemistry*, 46: 310-317, 2011.
- POVOLO, S.; TOFFANO, P.; BASAGLIA, M; CASELLA, S. Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose. *BioresourceTeclonology*, 26: 7902-7907, 2010.
- PRADELLA, J.G.C. - Biopolímeros e Intermediários Químicos, relatório técnico nº 84396-205, Centro de Tecnologia de Processos e Produtos, Laboratório de Biotecnologia Industrial – LBI/CTPP, 2006.
- RAMSAY, B.A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBÉ, B.; BATAILLE, P.; RAMSAY, J.A. Procuction of poly- β -hydroxybutirate-co-hydroxyvaleric acids. *Appl. Environ. Microbiology*, 56: 2093-2098, 1990.
- REHM, B.H.A. Poliester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal*, 376: 15-33, 2003.
- ROSA, D.S.; HANG-CHUI, Q.S.; PANTANO FILHO, R.; AGNELLI, J.A.M. Avaliação da biodegradação de poli-hidroxibutirato, polihidroxibutiratoco-valerato e poli- ξ -caprolactona em solo compostado. *Polímeros*, 12: 311-317, 2002.
- ROSSI, M.; GRIFFITH, C.H.; GEARHART, J.; JUSKA, C. Rumo sustentável plásticos. Um relatório sobre as seis principais montadoras. Um relatório da Ecologia Center, EUA, 2005.
- SAHGAL, M.; JOHRI, B. N. The changing face of rhizobial systematics. *Current Science*, 84: 43-48, 2003.
- SCANDOLA, M.; FOCARETE, M.L.; ADAMUS, G.; SIKORSKA, W.; BARANOWSKA, I.; SWIERCZEK, S.; GNATOWSKI, M.; KOWALCZUK, M.; JEDLINSKI, Z. *Macromolecules*, 30: 2568, 1997.
- SHEN, L.; HAUFE, J.; PATEL, M. K. Product overview and market projection of emerging bio-based plastics. Copernicus Institute for Sustainable Development and Innovation Utrecht University, 2009.
- SILVA, D.J.P. Resíduos na indústria de laticínios. Série Sistema de Gestão Ambiental, Viçosa-MG, 20p., 2011.
- SILVA, L.F.; GOMES, J.C.C. Cepa mutante de *Bhurkolderia sp* e método de obtenção de cepa. Patente Brasileira PI 980657-2, 1998.
- SILVA, L.F.; GOMES, J.C.C.; ROCHA, R.C.S.; TACIRO, M.K.; PRADELLA, J.G.C. Produção biotecnológica de polihidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. *Química Nova*, 30: 1732-1743, 2007.
- SOLAIMAN, D.K.Y.; ASHBY, R.D.; FOGLIA, T.A.; MARMER, W.N. Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71: 783-789, 2006.

- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. Handbook for rhizobia. New York: Springer-Verlag., 450 p., 1994.
- SQUIO, C.R.; ARAGÃO, G.M.F. Estratégias de cultivo para produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-hidroxi-butirato) e poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) por bactérias. *Química Nova*, 27: 615-622, 2004.
- STANLEY, J.S.; BROWN, G.G.; VERMA, D.P.S. Slow-growing *Rhizobium japonicum* comprises two highly divergent symbiotic types. *Journal of Bacteriology*, 163: 148-154, 1985.
- STEINBUCHER, A. Polyhydroxyalkanoic acids. In: D. Byrom (ed.), *Biomaterials: novel materials from biological sources*, 124-213, 1991.
- SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polymer. Sci.*, 25: 1503-1555, 2000.
- TAGUCHI, S.; NAKAMURA, H.; KICHISE, T.; TSUGE, T.; YAMATO, I.; DOI, Y. Production of polyhydroxyalkanoate (PHA) from renewable carbon sources in recombinant *Ralstonia eutropha*. Using mutants of original PHA synthase. *Biochemical Engineering Journal*, 16: 107-113, 2003.
- TAVERNIER, P.; PORTAIS, J.C.; SAUCEDO, J.E.N.; COURTOIS, J.; COURTOIS, B.; BARBOTIN, J.N. Exopolysaccharide and poly- β -hydroxybutyrate coproduction in two *Rhizobium meliloti* strains, *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 21-26, 1997.
- THORNE, L.; TANSEY, L.; POLLOCK, T.J. Direct utilization of lactose in clarified cheese whey for xanthan gum synthesis by *Xanthomonas campestris*. *J. Ind. Microbiol.* 3: 321-328, 1988.
- TOMBOLINI, R.; NUTI, M.D.; Poly(β -hydroxyalkanoates) biosynthesis and accumulation by different species, *FEMS Microbiology*, 60: 299-304, 1989.
- TSUGE, T. Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. *J. Biosci. Bioeng.* 94: 579-584, 2002.
- VALAPPIL, S.P.; PEIRIS, D.; LANGLEY, G.L.; HEMIMAN, J.; BOCCACCINI, A.R.; BICKE, C.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized *Bacillus* spp. *Journal of Biotechnology*, 127: 475-487, 2007.
- WONG, F.; LEE, S.Y. Poly(3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. *Applied Environmental Microbiology* 63: 3703-3706, 1997.
- WONG, H.H.; LEE, S.Y. Poly-(3-hydroxybutyrate) production from whey by high-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 50: 30-33, 1998.
- WILLEMS, A. The taxonomy of Rhizobia: an overview. *Plant and Soil*, 287: 3-14, 2006.

WILLKE, T.; VORLOP, K.D. Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 66: 131-142, 2004.

ZINN, M.; WITHOLT, B.; EGLI, T. Occurrence, synthesis and medical application on bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53: 5-21, 2001.

YAMANE, T. Yield of poly-D(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study. *Biotechnology Bioeng.*, 41: 165-170, 1993.