



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

PALLOMA FARIAS DA SILVA

**PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO POR *Bacillus* sp. UTILIZANDO SUBSTRATO
NÃO CONVENCIONAL**

JOÃO PESSOA – PB

2016

PALLOMA FARIAS DA SILVA

**PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO POR *Bacillus* sp. UTILIZANDO SUBSTRATO
NÃO CONVENCIONAL**

Trabalho de conclusão de curso como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia na Universidade Federal da Paraíba.

Orientadora:

Prof^a Dr^a Andréa Farias de Almeida

JOÃO PESSOA – PB

2016

S586p Silva, Palloma Farias da.
Produção de biopolímero por *Bacillus* sp. utilizando substrato não convencional / Palloma Farias da Silva.- João Pessoa, 2016.
52f. : il.
Orientadora: Andréa Farias de Almeida
Trabalho de Conclusão de Curso - TCC (Graduação) - UFPB/CB
1. Biotecnologia. 2. Biopolímeros. 3. Poli-hidroxialconato. 4. Fermentação submersa. 5. *Bacillus* sp.

UFPB/BC

CDU: 62(043.2)

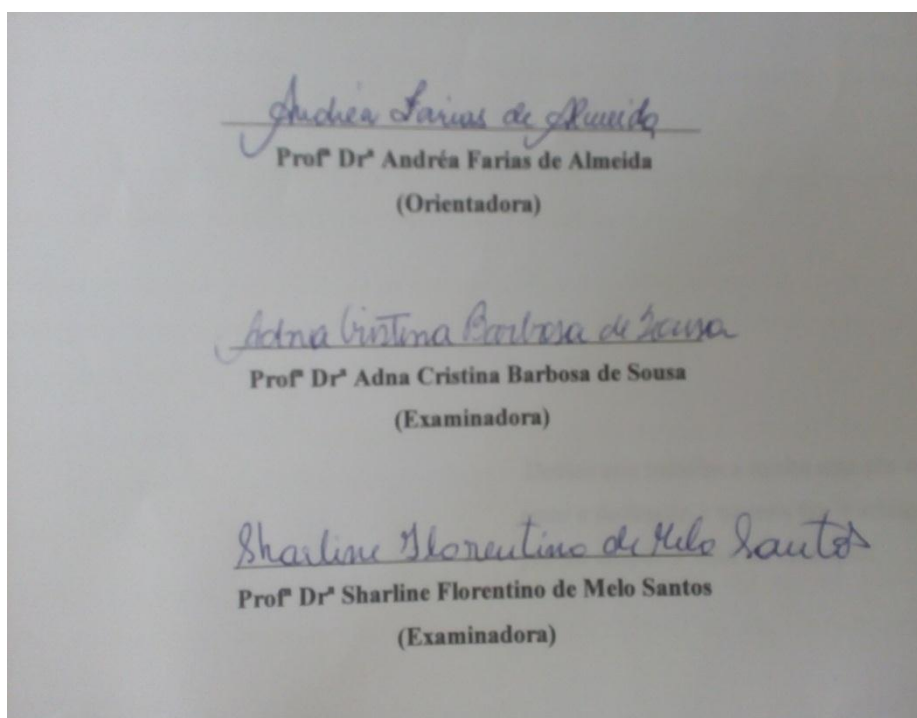
Palloma Farias da Silva

**PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO POR *Bacillus* sp. UTILIZANDO SUBSTRATO
NÃO CONVENCIONAL**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) submetido ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em: 18 de Novembro de 2016

BANCA EXAMINADORA:



Dedico este trabalho a minha mãe por todo amor e dedicação e ao meu tio Washington por me ensinar o valor da educação!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a **Deus**, pois sem ele nada seria possível!

Á **minha família**, por estar sempre comigo, em especial a minha **mãe** que sempre batalhou e se sacrificou pela minha educação e ao meu **tio Washington** por ser meu exemplo de ética e dignidade.

Á **Universidade Federal da Paraíba** e ao **Centro de Biotecnologia** por me possibilitarem esse processo evolutivo.

Ao **Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp)**, por me dar o suporte necessário para realização dos meus experimentos e a equipe do LEBp (**Araunna Lima, Emanuele Cardoso, Adrielly Andrade e César Dias**) pela parceria, conhecimento compartilhado e por juntos termos construindo um lugar harmônico para se trabalhar.

Á minha orientadora e professora, **Andréa Farias de Almeida**, por ter aceito ser minha orientadora, pelo apoio que me foi fornecido durante toda a pesquisa, pelos ensinamentos didáticos e pela confiança.

Ao **Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular**, por disponibilizarem seus equipamentos que foram necessários no desenvolvimento da minha pesquisa e aos seus integrantes **Teresa Cristina**, pela ajuda na pesquisa e por ter sempre me recebido com simpatia no laboratório e ao **Patrício** que ajudou diretamente na pesquisa, tanto de forma técnica como teórica, disponibilizando parte do seu tempo para mim ajudar. Nunca vou esquecer a ajuda de vocês que tanto me ensinaram.

Ao **Laboratório de Bioengenharia** e ao **Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas**, por disponibilizarem seus equipamentos para a construção do meu estudo.

A **todos os professores que passaram pela minha vida**, por contribuírem no meu crescimento e formado parte do meu senso crítico, é com toda a certeza que digo que nada seria o mesmo sem a participação de cada um em minha vida.

Um agradecimento especial ao meu professor de biologia do ensino médio, **Kleber**, por ter sido o primeiro a me apresentar a biotecnologia, fazendo com que despertasse em mim um crescente interesse na área.

À professora **Fabíola**, por sempre me escutar de forma atenciosa no decorrer do curso, ao professor **Enéas**, pelas conversas e conselhos que me fizeram refletir, ao professor **Demétrius**,

por ter sido o primeiro, no início do curso, a abrir as portas do laboratório para mim e ao professor **Lindomar** pelas palavras de incentivo em suas aulas.

As amigas que fiz durante o curso: **Elizanete Maciel, Olivia Costa, Ludmilla Sales e Arauana Lima**. Nunca vou esquecer todo apoio e ajuda pessoal que me foi dedicado, todas as risadas, os estudos em grupo, as reflexões na hora do almoço, os momentos de aflições e de alegrias que compartilhamos. Terminei o curso com a certeza de que vocês são o maior presente da graduação.

A um dos homens mais especial em minha vida, **Rodrigo Frazão**, por sempre estar ao meu lado me apoiando e nunca me deixando desistir. Sua presença foi muito importante nesta etapa da minha vida.

À **Glaydson e Bruno** por escutarem minhas alegrias e lamentações no decorrer do curso.

À minha banca examinadora que dividiram comigo este momento tão importante e esperado: **Adna Cristina e Sharline Florentino**.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

(Charles Chaplin)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química dos polihidroxicanoato.	19
Figura 2: Via Biosintética do P (3HB).	20
Figura 3: Distribuição de depósito de patente por países.	24
Figura 4: Imagem da algarobeira.	26
Figura 5: Estrutura interna da vagem da algarobeira.	26
Figura 6: Diversas aplicabilidades da vagem da algarobeira.	27
Figura 7: Ajuste do PH em diferentes pHmetro.	30
Figura 8: Meios de cultivo contendo como fontes de carbono glicose e algaroba, respectivamente.	31
Figura 9: Erlemmeyers contendo meio de cultura estéril e meio de cultura após 27h de cultivo.	31
Figura 10: <i>Pellet</i> ressuspensão com 5mL de água estéril.	33
Figura 11: Reação dos <i>pellets</i> das amostras de 24 horas do experimento com glicose e algaroba, sequencialmente, em 5 mL de clorofórmio.	33
Figura 12: Perfil cinético da produção de PHB utilizando a glicose como substrato (experimento 1).	35
Figura 13: Perfil cinético da produção de PHB utilizando a glicose como substrato (experimento 2).	37
Figura 14: Perfil cinético da produção de PHB utilizando o extrato de algaroba como substrato (experimento 1).	38
Figura 15: Perfil cinético da produção de PHB utilizando o extrato de algaroba como substrato (experimento 2).	39
Figura 16: Indicativo de produção de PHB do primeiro cultivo com glicose.	40
Figura 17: Indicativo de produção de PHB do Segundo cultivo com glicose.	41
Figura 18: Indicativo de produção de PHB do primeiro cultivo com algaroba.	41
Figura 19: Indicativo de produção de PHB do segundo cultivo com algaroba.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Capacidade de substituição de polímeros de origem fóssil por biopolímeros.	18
Tabela 2: Micro-organismos capazes de produzir PHA.	21
Tabela 3: Classificação taxonômica do <i>Bacillus</i> sp.	23
Tabela 4: valores nutricionais da algaroba.	27
Tabela 5: Composição do meio sólido ágar Luria-Bertani.	29
Tabela 6: Parâmetros cinéticos do experimento 1 com glicose.	36
Tabela 7: Parâmetros cinéticos do experimento 2 com glicose.	37
Tabela 8: Parâmetros cinéticos do experimento 1 com algaroba.	38
9: Tabela Parâmetros cinéticos do experimento 2 com algaroba.	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDPS	Polímeros biodegradáveis
PHA	Poli – hidroxialconoato
PHA _A	Gene codificador da enzima phaA
PHA _B	Gene codificador da enzima phaB
PHA _C	Gene codificador da enzima phaC
PHB	Poli - hidroxibutirato
P (3HB)	Poli - 3-hidroxibutirato
P (3HV)	Poli (3-hydroxybutyrate- co -3-hidroxivalerato)
5POHV	Poli (3-hidroxi-5-fenilvalerato)
DNS	Ácido dinitro-salicílico
nm	Nanômetro
rpm	Rotação por minuto
NDPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
D.O.	Densidade ótica
HCl	Ácido clorídrico
MnSO ₄ .H ₂ O	Sulfato de manganês hidratado
NaOH	Hidróxido de sódio
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio heptahidratado
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio dibásico

SUMÁRIO

.....	16
1. INTRODUÇÃO	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1. Biopolímeros.....	17
2.2. Poli (hidroxialcanoatos) – PHA	18
2.2.1. POLI (3-HIDROXIBUTIRATO) – P (3HB)	19
2.2.2. BIOSÍNTESE DO P (3HB)	19
2.3. Microrganismos produtores de PHA.....	20
2.3.1. PRODUÇÃO DE PHA PELO GÊNERO <i>BACILLUS</i>	22
2.3.2 <i>BACILLUS</i> SP.	22
2.4. Produção Industrial do PHA.	23
2.4.1. APLICABILIDADE DO BIOPOLÍMERO	24
2.5. Produção de PHB por fermentação submersa.....	25
2.6. Substrato	25
2.6.1. ALGAROBA.....	26
2.7. Parâmetros cinéticos para o processo	28
3. METODOLOGIA	28
3.1. Microrganismo	29
3.2. Meio de crescimento	29
3.3. Extrato aquoso da algaroba.....	30
3.4. Inóculo	30
3.5. Produção do biopolímero.....	30
3.5.1. OBTENÇÃO DO <i>PELLET</i> PARA A EXTRAÇÃO DO BIOPOLÍMERO	31
3.6. Métodos Analíticos.....	31
3.6.1 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA	31
3.6.2. QUANTIFICAÇÃO DO SUBSTRATO	32

3.6.3. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE P(3)HB	33
3.6.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS.....	34
4. RESULTADOS	35
4.1. Cinética de crescimento e consumo de substrato dos experimentos com glicose	35
4.2. Cinética de crescimento e consumo de substrato dos experimentos com extrato aquoso de algaroba.....	38
4.3 Indicativos de produção de PHB utilizando glicose como substrato	40
4.4. Indicativo de produção de PHB utilizando extrato de algaroba como substrato.	41
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES.....	44
REFERENCIAS	45
ANEXO	52

RESUMO

Os biopolímeros são polímeros produzidos a partir de recursos renováveis por ação de diferentes organismos, como: micro-organismos, plantas e animais. É possível sintetizá-los quimicamente através de açúcares, óleos, amido e gordura. Em geral esses polímeros biológicos podem ser derivados de amido, ácido polilático, polímeros celulósicos e poli-hidroxicanoatos. Os poli-hidroxicanoatos especificamente são 100% biodegradáveis, produzidos por micro-organismos que utilizam os mesmos como fonte energética em condição de limitação de carbono. O objetivo deste trabalho foi avaliar a cinética de produção de biopolímero por *Bacillus* sp. através da fermentação submersa, utilizando glicose e extrato aquoso de algaroba como fontes de carbono, com o interesse de avaliar a potencialidade do extrato aquoso de algaroba como substrato alternativo. Os ensaios foram conduzidos em incubadora rotativa (150 rpm e 37° C, 48 h) utilizando frascos erlemmeyers de 125 mL, com volume de meio de 50 mL. Amostras foram retiradas periodicamente para avaliar a cinética de crescimento, o consumo de substrato e formação de biopolímero. O *Bacillus* sp utilizado neste experimento com os substratos analisados, mostrou como potencial produtor de biopolímero do tipo PHA – PHB. Os experimentos que utilizaram extrato de algaroba sugerem uma maior produção de biopolímero, concluindo que a algaroba é um substrato em potencial.

Palavras chaves: Biopolímeros. Poli- hidroxicanoato. Fermentação submersa. *Bacillus* sp.

ABSTRACT

Biopolymers are polymers can be produced from renewable resources through different organisms, such as microorganisms, plants and animals, it is also possible to synthesize them chemically through sugars, oils, starch and fat in general these biological polymers may be derived from starch, polylactic acid, cellulose polymers and poly- hydroxyalkanoates. The poly-hydroxyalkanoates specifically is 100% biodegradable, produced by microorganisms using the same as an energy source in carbon limitation condition. The objective of this work was to evaluate the kinetics of biopolymer production by *Bacillus* sp. Through submerged fermentation, using glucose and aqueous extract of mesquite as carbon sources, with the interest of evaluating the potential of the aqueous extract of mesquite as an alternative substrate. The assays were conducted in a shaker (150rpm and 37°C, 48h) using 125 ml erlemmeyer flasks, with a volume of 50 ml. Samples were collected periodically to evaluate growth kinetics, substrate consumption and biopolymer formation. The *Bacillus sp* used in this experiment with the analyzed substrates, showed as potential producer of PHA - PHB type biopolymer. Experiments using mesquite extract suggest a higher production of biopolymer, concluding that mesquite is a potential substrate.

Key words: Biopolymers. Poly-hydroxyalkanoates. Submerged fermentation. *Bacillus* sp.

1. INTRODUÇÃO

Há muito tempo que os polímeros sintéticos são utilizados de diversas formas na sociedade, fazendo dele um produto ainda indispensável no dia a dia. Contudo, esses polímeros são bastante ofensivos para o meio ambiente, devido à sua resistência de decomposição, sua toxicidade e a grande acumulação de resíduos oriundos de seus derivados.

Outra grande desvantagem é o fato de serem totalmente dependentes de fontes não renováveis, como o petróleo, porém graças ao progresso e a necessidade atual, a ciência e tecnologia vem pesquisando outras formas de materiais poliméricos com capacidade de conter boas características físicas que possam substituir os polímeros sintéticos (MACEDO, 2015; CHANPRATEED, 2010).

Uma alternativa aos polímeros sintéticos é a produção de biopolímeros a partir de fontes renováveis devido à sua capacidade de biodegradação. Tais polímeros biológicos podem ser derivados de amido, ácido poliláctico, polímeros celulósicos e poli-hidroxicanoatos (PHA) (NATH et al., 2008 apud ROSSA, 2012)

Os poli-hidroxicanoatos são produzidos por micro-organismos como fonte energética, e em condição de limitação de carbono podem ser consumidos pelo próprio metabolismo microbiano. Entre os polímeros de PHA sintetizados o poli-hidroxibutirato (PHB) foi o primeiro a ser descoberto e é atualmente o mais pesquisado e o melhor caracterizado. O PHB é um produto intracelular encontrado em forma de grânulos no protoplasma de muitas bactérias, podendo chegar a uma concentração de 80% do peso seco das células produtoras (BERWING, 2016).

Cerca de 20 gêneros bacterianos e um total de 120 isolados já foram extraídos de amostras de diferentes solos. Em torno de 62 isolados apresentaram resultados positivos para grânulos de PHB, entre eles: *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijernickia*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Rhodospirillum*. (PRASANNA et al., 2011; BHUWAL et al., 2014)

Segundo pesquisadores, geralmente bactérias do solo são mais propícias a produzir PHB graças as condições de pH, temperatura e nutriente do solo (ASLIM; YUKSEKDAG; BEYATLI, 2002).

O biopolímero produzido a partir destes organismos é utilizado numa grande variedade de produtos. Os organismos gram-positivos, como o *Bacillus* sp. possuem a capacidade de

crescer por uma infinidade de substratos baratos, porém o grande obstáculo das estirpes de *Bacillus* é a dificuldade em acumular PHB. Em contrapartida, o PHB pode ter uma boa produção quando utilizadas fontes de carbono refinadas e de alto custo.

Essa exigência na produção industrial inviabiliza a fabricação do PHB por *Bacillus* no mercado. A dificuldade de produção incentiva à pesquisa de fontes alternativas de substratos que possuam baixo custo e que de preferência sejam renováveis (WU et al., 2001).

A algarobeira, pertencente à família Leguminosae e gênero *prosopis*, não é uma planta nativa do Brasil, mas teve uma fácil adequação ao clima do país, principalmente quando se trata da região Nordeste, a sua adaptação se caracterizou devido a sua resistência à seca (CLOVIS, 2009).

O fruto da planta é uma vagem conhecida por conter uma grande quantidade de sacarose, possuindo cerca de 60 % de açúcares em sua polpa. Entretanto, o fruto ainda é composto de gordura, vitaminas, sais minerais e proteínas. Por ser rica em açúcares, especialmente em sacarose, este fruto pode ser utilizado como fonte de carbono para processo fermentativo (CLOVIS, 2009).

Na literatura, a sua atuação com essa finalidade já foi descrita por Nascimento et al. (2013) que estudaram a produção de celulose bacteriana utilizando o extrato de algaroba como fonte alternativa de carbono.

Neste contexto, o presente trabalho avaliou a produção de biopolímero a partir de *Bacillus* sp. através da fermentação submersa, utilizando glicose e extrato de algaroba, respectivamente como substrato.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Biopolímeros

Os biopolímeros são polímeros produzidos a partir de recursos renováveis por ação de diferentes organismos, como: micro-organismos, plantas e animais, como também são possíveis sintetizá-los quimicamente, através de açúcares, óleos, amido e gordura. Em sua maioria é biodegradável e não tóxico ao ambiente (FLIEGER et al., 2003).

Os polímeros biodegradáveis (BDPs) ou plásticos biodegradáveis são definidos como materiais poliméricos capazes de sofrer decomposição na presença de dióxido de carbono,

metano, água, compostos inorgânicos, ou biomassa proveniente de uma ação enzimática de micro-organismos (FRANCHETTI e MARCONATO, 2006). Atualmente, os BDPs vêm mostrando progressos significativos em novas estratégias de *design* e engenharia para fornecer polímeros avançados com melhor desempenho e com características similares aos polímeros convencionais (LUCKACHAN et al, 2011).

Segundo Brito et al (2011), existe uma infinidade de evidências relacionando o meio ambiente com fatores sócio econômicos, que por sua vez, se relacionam diretamente ao surgimento crescente dos biopolímeros. Grandes impactos ambientais são causados pelos processos de extração e refino utilizados para produção dos polímeros provenientes do petróleo, assim como sua escassez e elevado custo que vem favorecendo ainda mais a produção de polímeros biológicos como uma alternativa viável e presente.

Muitas pesquisas ainda precisam serem feitas para melhorar a qualidade e o custo dos bioplásticos, pois ainda são mais caros e menos flexíveis, possuindo uma aplicação limitada quando comparado aos sintéticos (Tabela 1). Contudo, o diferencial dos biopolímeros está na sua capacidade de degradação, pois levam apenas de 6 a 12 meses para se decomporem, ao contrário dos polímeros sintéticos que podem chegar entre 40 a 200 anos de permanência no ambiente (COUTINHO, 2004).

Tabela 1: Capacidade de substituição de polímeros de origem fóssil por biopolímeros.

Polímero	PVC	PEAD	PEBD	PP	PS	PMMA	PA	PET	PC
Amido	-	+	+	+	+	-	-	-	-
PLA	-	+	-	+	+	-	+	+	-
PHB	-	+	-	++	+	-	-	-	-
PHBHx	+	++	++	++	+	-	-	+	-

++ substituição completa; + substituição parcial; - não substitui.

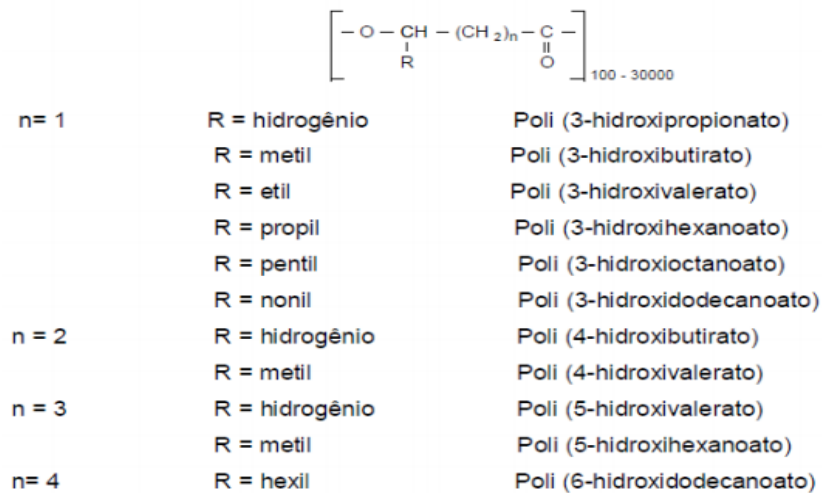
Fonte: (PRADELLA, 2006)

2.2. Poli (hidroxialcanoatos) – PHA

Os PHAs pertencem à família dos biopoliésteres e são biopolímeros sintetizados naturalmente por diversos micro-organismos (Figura 1) (BRITO et al., 2016). Estão geralmente presentes no citoplasma das células em formato de grânulos encapsulados por uma membrana (SERAFIM; LEMOS; REIS, 2003 apud FONSECA, 2014).

Vários fatores podem influenciar a produção de PHAs, como o tipo de micro-organismo, a duração da fermentação, a taxa de crescimento e a natureza de concentração das fontes de carbono (SHAHID et al., 2013). De acordo com Brito et al. (2016), a produção deste polímero biológico pode dar lugar a diferentes aplicações industriais.

Figura 1: Estrutura química dos polihidroxicalcanoato.



Fonte: (VIEGAS, 2005)

2.2.1. POLI (3-HIDROXIBUTIRATO) – P (3HB)

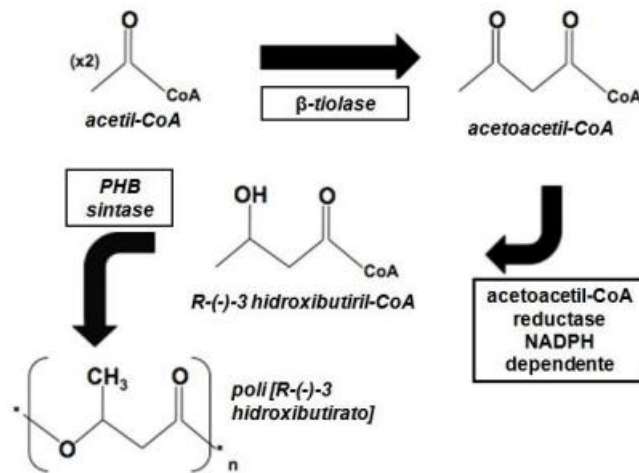
O P(3HB) é o principal polímero da família dos PHAs. Pertence ao grupo dos PHAs de cadeia curta, com monômeros contendo de 4 a 5 átomos de carbono (FONSECA, 2014). É produzido naturalmente por vários microrganismos, principalmente em resposta a condições de estresse como, limitação de nutrientes. O polímero é essencialmente um produto da assimilação de carbono (a partir de glicose ou amido) e é empregado por microrganismos como fonte de armazenamento de energia para ser metabolizado quando outras fontes de energia comuns não estão disponíveis (PANDA, 2006).

2.2.2. BIOSÍNTESE DO P (3HB)

O PHB é sintetizado a partir de acetil-CoA por bactérias produtoras, em ação sequencial de três enzimas (SHAH, 2014). A primeira reação envolve a condensação de duas moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetyl-CoA-redutase, a qual é catalisada por β -cetotiolase (codificada por PHA A). O segundo passo é a redução de acetoacetyl-CoA por um acetoacetyl-CoA-desidrogenase dependente de NADPH (codificada por PHA B). Por último, os monômeros de (R) -3-hidroxi butiril-CoA redutase são polimerizados em P(3HB) por P

sintase (3HB) (codificada por PHA C) (Figura 2) (SINGH et al., 2009 apud REDDY et al., 2003).

Figura 2: Via Biosintética do P (3HB).



Fonte: (STEINBUCHEL et al., 1992).

2.3. Microrganismos produtores de PHA

A síntese de PHAs está associada à capacidade da bactéria sintetizar hidroxiacil-CoA e da presença da enzima PHA sintase (LAVORATO, 2008).

Micro-organismos que sintetizam o PHA podem ser encontrados tanto em bactérias Gram positivas quanto em Gram negativas. Estima-se que 72 gêneros de bactérias já foram descritos como produtores do biopolímero (Tabela 2) (REDDY et al., 2003 apud CORÊA, 2014).

Os produtores de poli-hidroxialcanoatos podem ser classificados de duas formas: os que necessitam da limitação de algum nutriente como, N, P, Mg, K, O e excesso de carbono e aqueles que não necessitam da limitação de nutrientes, como exemplo deste último grupo podemos destacar o Gênero *Bacillus* (FACCIN, 2012).

Tabela 2: Micro-organismos capazes de produzir PHA.

Micro-organismo	Fonte de Carbono	PHA	PHA (% W/V)
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Gliconato	P(3HB)	46-85
	Propinato	P(3HB)	26-36
	Octanoato	P(3HB)	38-45
<i>B. megaterium</i> QMB 1551	Glicose	P(3HB)	20
<i>Klebsiella aerogenes</i> recombinante	Melaço	P(3HB)	65
<i>Methylobacterium ehodesanum</i> MB 127	Frutose/Metanol	P(3HB)	30
<i>Methylobacterium extorquens</i> (ATCC55366)	Metanol	P(3HB)	40-46
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Euphorbia e Óleo de rícino	PHA	20-30
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	Pentanol	P(3HV)	55
<i>Pseudomonas olearans</i>	Propinato	P(3HB)	1,1-5
	Octanoato	P(3HB)	50-68
<i>Pseudomonas Putida</i> GPp 104	Octanoato	P(3HB)	14-22
<i>P. putida</i>	Óleo de semente de palma	PHA	37
	Ácido Láurico	PHA	25
	Ácido Mirístico	PHA	28
	Ácido Oleico	PHA	19
<i>P. putida</i> BM01	Ácido fenoxi-dexonoico	SPOHV	15-35
<i>Sphaerotilus natans</i>	Glicose	P(3HB)	40

Fonte: Adaptado (REDDY et al., 2003)

2.3.1. PRODUÇÃO DE PHA PELO GÊNERO *BACILLUS*

Espécies do gênero *Bacillus* já foram identificados como micro-organismos produtores de PHB. Entretanto, devido a quantidade de espécies nem todos foram explorados de forma eficiente na produção do biopolímero.

O gênero *Bacillus* dispõe de um curto tempo para atingir altas densidades celulares, são capazes de crescer em fontes de carbono e nitrogênio de baixo custo, secretam grandes quantidades de enzimas e expressam genes heterólogos de forma satisfatória. Todas essas características são favoráveis para a produção do polímero biológico (KRUEGER, 2009 apud LAW et al., 2003). Apesar de todos serem constituintes de um único gênero, a maior produção de PHA pode variar no decorrer do crescimento da linhagem. Por ordem, o crescimento está diretamente relacionado à sua produção, logo a taxa de maior produtividade é geralmente na fase exponencial.

A linhagem *B. megaterium* é a mais estudada e foi a primeira a ser identificada por conter corpos de inclusão de P(3HB). Possui a capacidade de produzir o polímero a partir de diversas fontes de carbono, como sacarose, glicose, frutose, lactose, maltose e glicerol. Nos experimentos de McCool et al. (1996) sobre o acompanhamento do acúmulo de PHA em grânulos de *B. megaterium* em diferentes fases do crescimento, comprovaram que o maior acúmulo do biopolímero foi na fase exponencial e estacionária. Porém, a fase de crescimento celular é o momento de maior abundância.

Entre os *Bacillus* sp. relatados como sendo produtores de biopolímero, possuem rendimentos de P (3HB) que variam entre 11-69% presente em sua massa seca o que determinará o maior rendimento é a adaptação do micro-organismo ao meio de crescimento submetido (SINGH et al.,2009).

2.3.2 *Bacillus* sp.

Já existem citações de mais de 265 espécies e de 7 subespécies no gênero *Bacillus* sp, de acordo “List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature”.

O gênero *Bacillus* podem ser gram-positivos ou gram-negativos, possuem cílios peritríquios e devido a eles conseguem se locomover. Também são caracterizados por bastonetes com extremidades retas ou arredondadas contendo tamanhos variados. Em sua grande maioria, as espécies de *Bacillus* é saprófitas, estando amplamente distribuídas no ar, solo e água (GOMES, 2013).

Tabela 3: Classificação taxonômica do *Bacillus* sp.

Classificação taxonômica	
Reino	<i>Bacteria</i>
Sub-reino	<i>Posibacteria</i>
Filo	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordem	<i>Bacillales</i>
Família	<i>Bacillaceae</i>
Gênero	<i>Bacillus</i>
Espécie	<i>Bacillus</i> sp.

Fonte: *Integrated Taxonomic Information System (ITIS)*

2.4. Produção Industrial do PHA.

Uma das grandes preocupações da atualidade é a poluição ambiental em especial a produção desgovernada de resíduos sólidos que vem causando prejuízos variados para a sociedade e para natureza. Um dos principais componentes presentes no lixo é o plástico que em sua maior parte é despejado e não reciclado.

Na década de 1990, o Brasil passou a produzir plásticos biodegradáveis provenientes de derivados da cana-de-açúcar. A abertura desse novo mercado, a busca por polímeros biológicos capazes de serem produzidos a partir de biorreatores, tendo carboidratos como substrato, passou a ser uma realidade no país (COUTINHO et al., 2004)

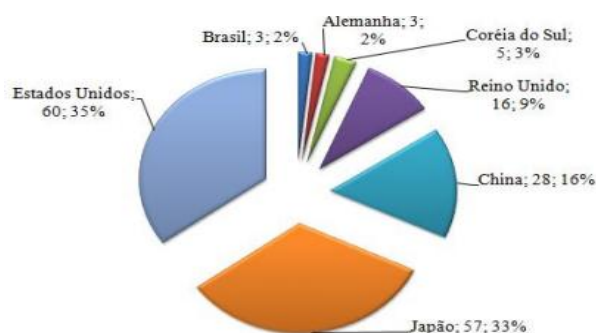
A qualidade e a semelhança do PHB com os polímeros sintéticos fez dele um dos polímeros mais escolhidos para dar início a produção de bioplásticos. A empresa Biocycle é pioneira na produção de PHB industrial no Brasil. Deu seu início em 1992 com objetivo de produzir um polímero biodegradável de fonte renovável. Em 1994 a empresa concluiu seus estudos e já em 1996 os primeiros lotes de PHB foram enviados para várias instituições de pesquisa. Atualmente a empresa já comercializa a nível nacional e internacional (BIOCICLE).

Estudar polímeros biológicos é necessidade da sociedade voltada para a articulação e implementação de novas tecnologias e ciência, para acompanhar o cenário mundial nas adaptações às novas necessidades ambientais (COUTINHO, 2007).

Um cenário bastante crescente é o depósito de patente relacionado ao poli-hidroxitirato em diferentes vertentes. Porém, a distribuição dos depósitos evidência que

existe uma concentração maior nos países com altos índices de desenvolvimento. Entretanto o interesse de potências mundiais afirma que estudar PHB é viável e rentável com suas expectativas de mercado positivas no decorrer dos anos (RIBEIRO e DRUZIAN, 2013). É possível observar uma participação ainda tímida, porém significativa do Brasil, o que mostra um interesse favorável para o desenvolvimento tecnológico do biopolímero (figura 3). De acordo com Ribeiro e Druzian (2013). Os dez maiores detentores da tecnologia, são 80% de empresas, 20% de universidades e apenas 10% de centros de pesquisa.

Figura 3: Distribuição de depósito de patente por países.



Fonte: (RIBEIRO e DRUZIAN, 2013).

Um problema que ainda dificulta a produção industrial em larga escala do biopolímero é o alto custo da produção. Cerca de 40% do custo total da produção é equivalente à matéria-prima. Atualmente, o principal objetivo é tornar o PHB economicamente viável e de fácil processo e manuseio. Portanto, a utilização de fontes de carbonos de baixo custo ou mesmo resíduos de materiais orgânicos podem ser uma alternativa a curto prazo (SINGH, 2013; SINGH, 2016).

2.4.1. APLICABILIDADE DO BIOPOLÍMERO

O biopolímero em questão tem a sua aplicabilidade associada ao fato de obter características semelhantes ao polipropileno que é um polímero de alta resistência. Características, como elevada cristalinidade, resistência à água, pureza óptica, resistência à mistura, boa estabilidade a radiação UV, barreira não permeável a gases, além de alta biocompatibilidade e regularidade nas cadeias carbônicas que são comuns em ambos os polímeros. Essas características fazem do biopolímero um forte concorrente na substituição dos polímeros sintéticos (RODRIGUES, 2005).

A sua eficiência e aplicabilidade vêm ganhando espaço no decorrer dos anos e já se pode destacar uma infinidade de produtos derivados do PHB em diversos setores industriais. As aplicações mais primárias são as fabricações de embalagens para higiene, limpeza,

cosméticos e produtos farmacêuticos (ORTEGA, 2006). Na atualidade, com o aumento de pesquisas na área, novas aplicações vêm sendo adotadas.

O P(3HB) vem se destacando na engenharia de tecidos e nas construções de órgãos artificiais, mais precisamente na construção de válvulas cardíacas, ossos artificiais, andaimes para miotubos esqueléticos e tecido nervoso. Na área farmacêutica, vem sendo de grande interesse na construção de nanopartículas capazes de liberar o fármaco em lugar específico de ação. Na literatura ainda podemos encontrar biosensores e biomarcadores utilizando biopolímero o que comprova sua ampla aplicação (PEÑA et al, 2014).

2.5. Produção de PHB por fermentação submersa

A fermentação submersa ocorre em meio com presença de água livre e normalmente com substratos solúveis. A definição biotecnológica da fermentação refere-se de como é executada, fazendo referência ao processo de conversão química de substratos em produtos, através da ação de microrganismos, onde a transformação é catalisada por enzimas (REGULY, 1998). Proporciona, ainda, uma melhor transferência de massa e calor, trazendo vantagens na modelagem e no controle do sistema. Porém, a desvantagem do processo é o alto custo de energia e a possibilidade de contaminação (JAIN; MORLOQ E HENSON, 2013; HOLKER e LENZ, 2005)

A escolha do processo fermentativo está diretamente relacionada com o objetivo do estudo. No caso da produção do PHB, existem duas maneiras: *in vitro*, via polimerização catalisada por PHA polimerase; ou *in vivo*, através da fermentação submersa, esse último é o mais utilizado entre os pesquisadores da área. A preferência da produção por fermentação submersa se deve ao fato de permitir o acompanhamento do crescimento microbiano, assim como os parâmetros cinéticos podem ser verificados no decorrer do cultivo, influência de fatores como agitação, oxigênio dissolvido, concentração de nutrientes, pH, temperatura. Além da produtividade e a qualidade dos polímeros produzidos no processo (SANTOS et al., 2011; ZINN et al., 2001).

2.6. Substrato

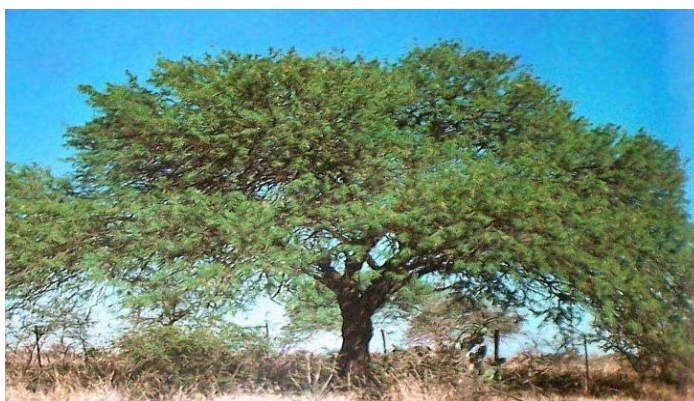
A escolha do substrato é uma das principais etapas de um processo fermentativo, pois é devido a sua conversão que se obtém o produto de interesse. O substrato é considerado a principal fonte de carbono para o desenvolvimento do micro-organismo, sendo que o mais utilizado para produção de biopolímero é a glicose. Todavia, existem inúmeros substratos que podem ser utilizados, sejam eles de origem orgânica ou sintética. Atualmente, o maior

interesse é por substratos de origem renovável, ou seja, resíduos ou subprodutos de outros processos industriais que não tóxicos e que apresentem baixo custo (VANZIN, 2008).

2.6.1. ALGAROBA

A algarobeira pertencente à família: Leguminosae, subfamília: Mimosácea, gênero: *Prosopis* e espécie: *Prosopis juliflora* (BARROS, 1981). A planta não é nativa do Brasil, entretanto, se adaptou facilmente as condições climáticas das regiões áridas e semiáridas, com capacidade de se desenvolver em solos salinos nas diferentes áreas do Nordeste. Dentre as características que as favorecem, é o seu rápido crescimento e frutificação, apresentando período de floração na época mais seca do ano, e se mantém por todo o ano, devido a essa característica tornou-se resistente ao clima da região semiárida do Brasil; geralmente sua produção é conservada durante trinta a quarenta anos (GOMES, 1973; BARBOSA, 1977; SILVA, 2009)

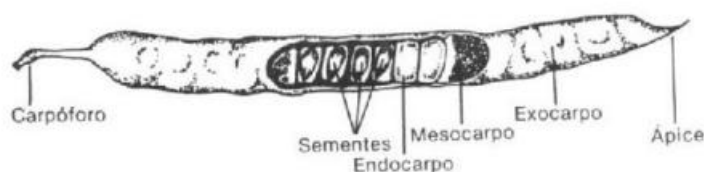
Figura 4: Imagem da algarobeira.



Fonte: (VIVEIROIPE)

A algaroba é o fruto da algarobeira e podendo medir entre 15 a 30 cm de comprimento e 1 a 2 cm de largura, com peso variando entre 4 e 8g (VALDIVIA, 1972). Este fruto é composto de epicarpo, mesocarpo e endocarpo. O mesocarpo é rico em sacarose, também é encontrado proteínas, lipídios, fibras, minerais e outros carboidratos.

Figura 5: Estrutura interna da vagem da algarobeira.



Fonte: (ALMEIDA, 1983)

Nas vagens de algaroba, pode-se encontrar como parte de sua constituição polímeros próprios, denominados como gomas, nos quais são obtidos do exsudado (da planta) e outro extraído dos próprios frutos (GALÁN, 2009). A goma, do tipo galactomanana, é produzida em escala industrial podendo ser utilizada na alimentação ou até mesmo como estabilizantes e espessantes de bebidas, molhos e sorvetes. É considerada de grande importância na tecnologia de alimentos e atualmente possui um elevado custo no mercado (MIRA, 2001)

Tabela 4: valores nutricionais da algaroba.

Autores	Lima & Lima (1985)	Del Valle et al. (1983)
Umidade (%)	17,10	9,00
Proteína (%)	9,44	14,70
Lipídios (%)	1,22	3,20
Fibra (%)	20,02	21,30
Minerais (%)	3,80	3,20
Carboidratos	45,40	46,30

Fonte: (SILVA, 2009)

No geral, a polpa do fruto ocupa 56% do espaço e contém 60% de açúcares, dos quais 96% é sacarose (GRADOS e CRUZ, 1996). O excesso de açúcar pode dar origem a produção de álcool e bebidas tornando a sua produção vantajosa industrialmente, sem contar com os produtos provenientes da madeira, flores, folhas e caules (Figura 6).

Figura 6: Diversas aplicabilidades da vagem da algarobeira.



Fonte: (SILVA, 2009)

2.7. Parâmetros cinéticos para o processo

Devido ao fato que a concentração microbiana X aumenta durante um cultivo fermentativo, é possível quantificar a velocidade específica deste crescimento (μ_x) (Equação 1).

$$\mu_x = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

E durante a fase exponencial de crescimento microbiano, esta velocidade específica é máxima e constante (μ_{\max}). O μ_{\max} pode ser estimado pela linearização dos valores de concentração celular durante a fase exponencial, além disso, pode-se estimar também o tempo de geração da linhagem durante o cultivo que é dado pela equação (2):

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2)$$

Outra definição de velocidade que visa a avaliação do desempenho de um processo fermentativo, é a produtividade em biomassa, expressa na equação 3, mostrando que a produtividade representa a velocidade média de crescimento referente ao tempo final de fermentação, t_f .

$$P_x = \frac{X_m - X_0}{t_f} \quad (3)$$

Além disso, é possível quantificar no cultivo os fatores de conversão. O fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$), descrito por MONOD (1949), está expresso na equação 4.

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (4)$$

Em que: X é a concentração final de células, X_0 a concentração inicial, S_0 a concentração inicial de substrato e S a concentração final de substrato no final do processo fermentativo. Com o uso desta equação, é possível conhecer quanto de substrato é consumido para alcançar uma concentração celular pontual.

3. METODOLOGIA

O experimento teve como finalidade avaliar a produção do PHB e do crescimento microbiano utilizando dois substratos diferentes como fonte de carbono. A glicose e o extrato aquoso de algaroba foram as duas fontes utilizadas nesse estudo. Para cada substrato, foram

realizados dois cultivos (duplicata) com duração de 48h, analisou-se o crescimento microbiano, o consumo de substrato e a produção de PHB entre ambos. Os experimentos com glicose foram classificados como padrão, já que é a fonte convencional do microrganismo, e o extrato aquoso da algaroba foi classificado como substrato alternativo para produção de biopolímero,

3.1. Microrganismo

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi o *Bacillus* sp, isolado de solo canavieiro da região. A linhagem foi fornecida pelo Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFPB.

O *Bacillus* sp. foi mantido em meio de manutenção ágar Luria-Bertani (Tabela 5). A manutenção foi realizada periodicamente e armazenadas a 4°C.

Tabela 5: Composição do meio sólido ágar Luria-Bertani.

Composição	Concentração (g/L)
Triptona	10
Extrato de levedura	5
Ágar	5

Fonte: Cold Spring Harbor Protocols (CSH protocols).

3.2. Meio de crescimento

O meio de crescimento utilizado para o inóculo e para os experimentos de produção do biopolímero apresentava a composição conforme mostra a Tabela 6:

Tabela 6: Composição do meio de crescimento.

Composição	Concentração (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
KH ₂ PO ₄	3,0
K ₂ HPO ₄	7,0
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2
Extrato de levedura	1,0

Substrato (glicose ou extrato aquoso da algaroba)	20 ou 18°Brix
---	---------------

Fonte: BUGAY (2009,modificado)

3.3. Extrato aquoso da algaroba

O substrato utilizado no processo fermentativo foi o extrato aquoso da algaroba produzido a partir de vagens coletadas no município de Japi – RN. A extração foi realizada no Laboratório de Fermento-Destilados do Centro de Tecnologia da UFPB, seguindo a metodologia descrita por Silva et al. (2003).

3.4. Inóculo

A reativação celular foi realizada em frascos erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio de crescimento (Tabela 5), o meio utilizado no inóculo foi o mesmo meio dos experimentos. A transferência do micro-organismo ao meio de crescimento foi realizada com auxílio de uma alça de platina para a retirada de colônias de bactérias crescidas em tubos inclinados para os frascos com o meio de cultivo, incubados em mesa agitadora (150 rpm e 37°C). O crescimento do micro-organismo foi acompanhado por absorvância (D.O. a 600nm), ao alcançar a absorvância de 0,8, foi transferido um volume de 10% (v/v) para o frasco de cultivo.

Figura 7: Ajuste do PH em diferentes pHmetro.



Fonte: autor

3.5. Produção do biopolímero

Para avaliar a produção de biopolímero, foi acompanhado o crescimento microbiano e consumo de substrato, utilizando glicose e extrato aquoso da algaroba, separadamente. Assim, primeiramente, foram realizados experimentos com a glicose, caracterizados como padrão e depois, os experimentos com o extrato aquoso de algaroba como substrato.

Figura 8: Meios de cultivo contendo como fontes de carbono glicose e algaroba, respectivamente.



Fonte: Autor.

Os ensaios foram realizados em erlemmeyers de 125 mL, com volume de meio de 50 mL, conduzidos em incubadora rotativa refrigerada a 150 rpm e 37°C durante 48h. Amostras foram retiradas em 0, 3, 6, 9, 24, 27, 33 e 48 horas para avaliação das variáveis do processo.

Figura 9: Erlemmeyers contendo meio de cultura estéril e meio de cultura após 27h de cultivo.



Fonte: Autor

3.5.1. OBTENÇÃO DO *PELLET* PARA A EXTRAÇÃO DO BIOPOLÍMERO

A biomassa para extração do biopolímero foi obtida por centrifugação do caldo fermentado em cada tempo de retirada de amostra. O caldo fermentado foi centrifugado (3600 rpm por 10min), o sobrenadante foi retirado e guardado para as análises das variáveis cinéticas e o *pellet* formado foi congelado para análises futuras.

3.6. Métodos Analíticos

3.6.1 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA

O crescimento microbiano foi acompanhado através do método turbidimétrico a 600nm e gravimétrico por peso seco.

Para determinar a biomassa foi realizada a medida gravimétrica como método de quantificação, para mensurar o crescimento microbiano durante o cultivo. A medida se baseia no peso microtubo vazio, menos o valor da massa seca dividido por volume de amostra, conforme equação 4.

Primeiramente foram pesados microtubos vazios (a análise foi realizada em triplicata) que estava há 24 horas em uma estufa (OLIDEF-CZ) a 80 °C. Em seguida, 2 mL de amostra foram inseridos em cada microtubo e levados para serem centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi despejado e o *pellet* lavado duas vezes com água destilada. A lavagem ocorreu com a adição de 2 mL de água destilada sobre o *pellet* que foi centrifugado com os mesmos parâmetros, o sobrenadante foi novamente despejado, o microtubo com o *pellet* foram levados para estufa a 80 °C e permaneceram por 24h, após esse período os tubos foram pesados e obtendo o peso massa seco, conforme equação 5.

$$Peso\ seco\left(\frac{g}{mL}\right) = \frac{(massa\ do\ microtubo+pellet\ livre\ de\ umidade)-massa\ do\ microtubo}{volume\ da\ amostra} \quad (5)$$

Além da análise por gravimetria, foi realizada em cada retirada de amostra a absorvância do cultivo, através da densidade óptica (DO) que faz relação entre turbidez do meio com a quantidade células presentes no meio. Para medir a absorvância foram retirados 4 mL de meio e colocados em uma cubeta de vidro. A cubeta foi inserida em espectrofotômetro de luz UV visível (SPECTRO VISION) em comprimento de onda a 600nm, foi realizada também a leitura do branco, que se trata do meio de cultivo que não sofreu a ação do micro-organismo. Toda a análise foi realizada em triplicata.

3.6.2. QUANTIFICAÇÃO DO SUBSTRATO

O substrato foi quantificado através do método ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). O DNS tem como princípio a capacidade de se reduzir na presença de um açúcar redutor, ao ser reduzido, a sua coloração que posteriormente era amarelada passando a ser castanho. Essa mudança é referente a uma reação de oxidação que resultará em 3-amino-5-nitro-salicilato.

Para a realização da análise utilizamos 0,5 ml de sobrenadante de cada período de retirada da amostra, essas amostras foram diluídas 10 vezes e apenas 0,5 ml das diluições foram retirados e colocados em um tubo de ensaio. Posteriormente foram introduzidos 2,5mL de DNS em cada tubo e agitados para homogeneizar. Os tubos foram levados em banho maria por 10 min a 100 graus, foram então resfriados até a temperatura ambiente e adicionados 3 mL de água destilada, novamente foram homogeneizados e levados ao espectrofotômetro em 540nm para se obter a absorvância. Foi utilizado um branco como parâmetro com a

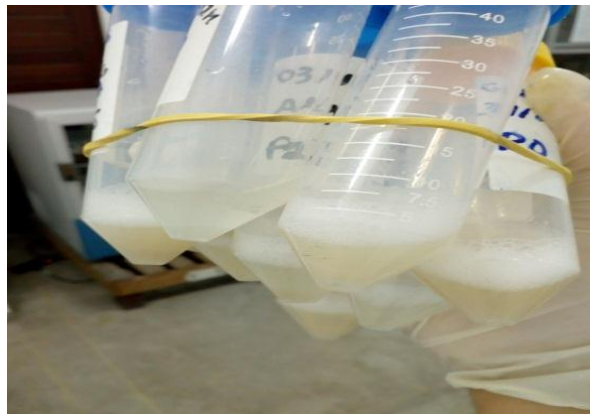
formulação de 0,5mL de água destilada no lugar da amostra. A curva padrão foi realizada utilizando diferentes diluições da solução de glicose a 1g/L (SANTOS, 2007).

Nos experimentos com o extrato aquoso de algaroba como fonte de carbono, as amostras precisaram ser previamente hidrolisadas, pois o açúcar contido na algaroba é a sacarose. O procedimento ocorreu com a introdução de 1 mL de cada amostra, 0,5 de ácido clorídrico e 6 ml de água em um balão volumétrico de 50 mL. O balão foi levado ao banho maria por 10 minutos sobre a temperatura de 70 °C, após a espera foram adicionados 2 ml de NAOH (4N) e de água destilada, até completar o volume do balão. Em seguida a análise ocorreu como a metodologia do DNS escrita acima, tendo agora o produto hidrolisado como amostra.

3.6.3. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE P(3)HB

Os *pellets* de cada experimento foram descongelados e ressuspensos em 5 mL de água estéril o conteúdo foi devidamente homogeneizados por *vortex*, em seguida foi utilizado um tratamento ultrassônico por 5 minutos.

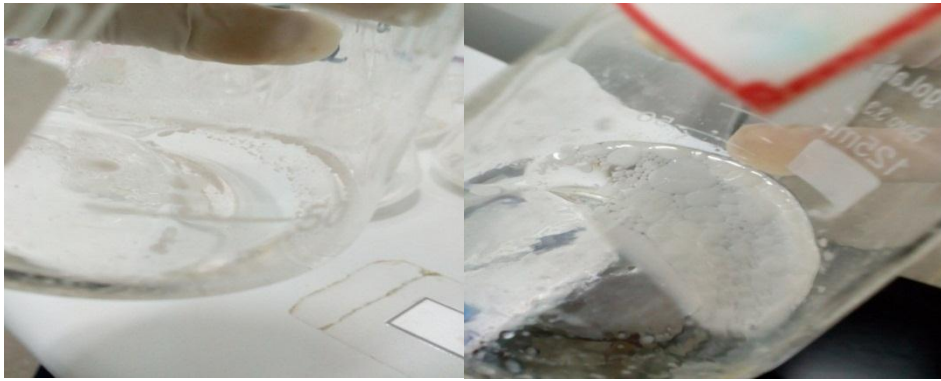
Figura 10: *Pellet* ressuspensão com 5mL de água estéril.



Fonte: Autor

Para cada 2 mL de suspensão celular foram adicionados 2 mL de HCl (2M) e levados a banho maria por 2 horas sobre a temperatura de 100 °C, após os tubos foram centrifugados a 9500 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi despejado e ao *pellet* foram adicionados 5 mL de clorofórmio, cada amostra foi colocado em frascos e deixado *overnight* a 37 °C em incubadora rotativa refrigerada a 150 rpm. O conteúdo de cada frasco foi centrifugado a 9500 rpm por 20 minutos e extraído com 0,1mL de clorofórmio, cada amostra foi colocada em estufa a 40 °C para secagem.

Figura 11: Reação dos *pellets* das amostras de 24 horas do experimento com glicose e algaroba, sequencialmente, em 5 mL de clorofórmio.



Fonte: Autor

Para o processo de quantificação, 5 mL de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados em cada amostra e foram aquecidas a 100 °C em banho maria por 20 minutos, na sequência foram refrigerados até a temperatura de 25 °C e homogeneizados. Em seguida a determinação da quantificação do P(3HB) foi em espectrofotômetro a 235nm. Para a leitura foi utilizando o ponto 0h como o branco (YLMAZ, M; SORAN, H; BEYATLI, 2005; SLEPECKY; LAW, 1960).

3.6.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

Os parâmetros cinéticos analisados foram a velocidade específica máxima de crescimento (μ_x), produtividade em células (P_x) e o fator de conversão de substratos em células ($Y_{x/s}$).

A velocidade específica máxima de crescimento (μ_x) foi estimada pelo método de detecção da fase de crescimento exponencial. Este método implica na linearização da fase exponencial de crescimento, onde a reta ajustada pela linearização fornece o coeficiente angular que equivale a velocidade específica máxima de crescimento das células no processo fermentativo.

A produtividade em células e o fator de conversão de substrato em células foram determinados pelas Equações 6 e 7, respectivamente (SCHMIDELL et al., 2001).

$$P_x = \frac{X_m - X_0}{t_f} \quad (6)$$

$$Y_{x/s} = \frac{X_m - X_0}{S_0 - S} \quad (7)$$

Em que:

X_m – Concentração máxima de células [g.L^{-1}]; X_0 – Concentração inicial de células [g.L^{-1}]; t_f – Tempo final de fermentação [h]; $Y_{X/S}$ – Fator de conversão de substrato em células [$\text{g}_s.\text{g}_x^{-1}$]; S_0 – Concentração inicial de substrato [g.L^{-1}]; S – Concentração final de substrato [g.L^{-1}]; P_x – Produtividade em células [$\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$]

4. RESULTADOS

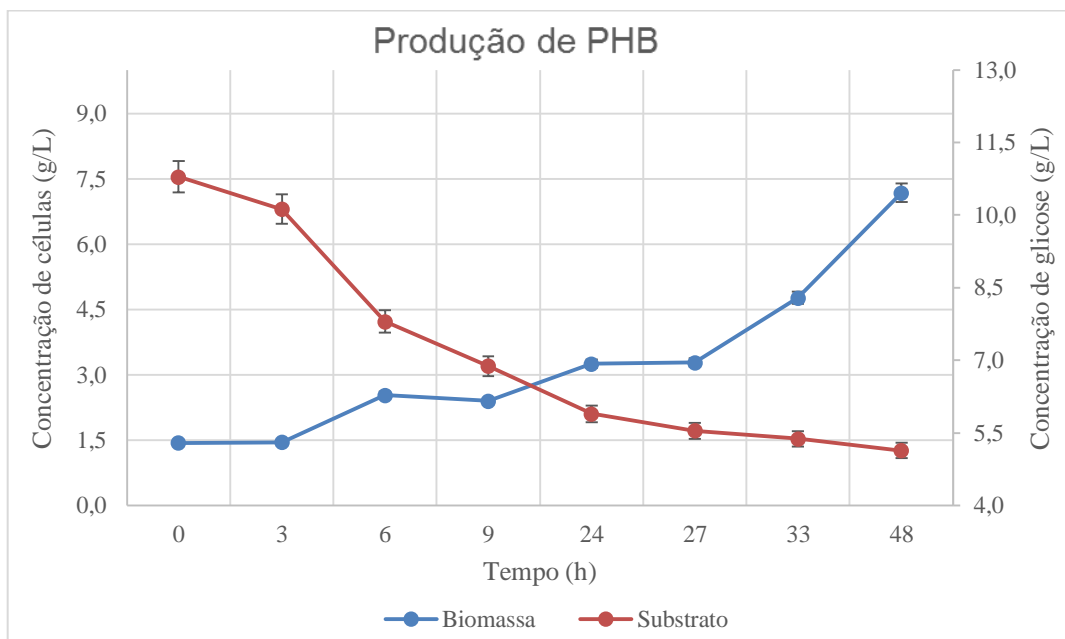
Ao longo das 48h de cultivo, foi observada uma mudança de coloração no meio do cultivo, onde visualmente o meio passou de transparente para turvo e um odor característico de um processo fermentativo.

4.1. Cinética de crescimento e consumo de substrato dos experimentos com glicose

Pode-se observar no gráfico (Figura 12), que a concentração de biomassa foi crescente ao longo das 48h de cultivo, obtendo-se uma concentração máxima de biomassa no valor de 7,2 g/L. A porcentagem de crescimento do tempo 0 a 48 h teve um aumento de aproximadamente 400%.

O consumo do substrato foi aumentando no decorrer das 48h, conforme observado no gráfico. Neste cultivo, aproximadamente 50% do substrato foi consumido no decorrer das 48h.

Figura 12: Perfil cinético da produção de PHB utilizando a glicose como substrato (experimento 1).



Fonte: Autor

Foram calculados os parâmetros cinéticos para o processo de produção de PHB, a velocidade máxima de crescimento, $\mu_{x \text{ máx}}$, e o fator de conversão de substrato em célula, $Y_{X/S}$. Para $\mu_{x \text{ máx}}$ foi encontrado o valor de $0,0346 \text{ h}^{-1}$ com um tempo de geração de 20,033 h e para $Y_{X/S}$ foi encontrado o valor de 1,0160 g de célula/g de glicose.

A velocidade de produção da biomassa em cada hora de cultivo também foi quantificada. O valor de P_x foi de $0,1196 \text{ g/L.h}$

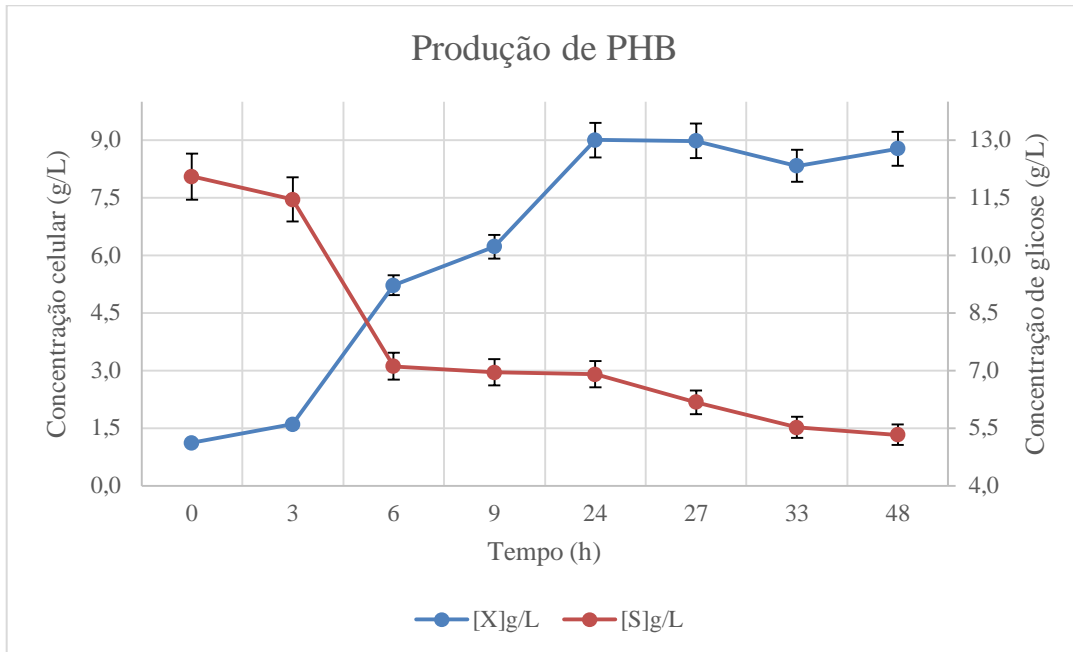
Tabela 6: Parâmetros cinéticos do experimento 1 com glicose.

Parâmetros	Valores	Unidades
$\mu_{x \text{ máx}}$	0,0346	h^{-1}
P_x	0,1196	$\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$
$Y_{X/S}$	1,0160	$\text{g}_x.\text{g}_s^{-1}$
t_g	20,033	h

Fonte: Autor

No segundo cultivo com glicose (Figura13), a concentração de biomassa também foi crescente, porém nos pontos de 24h até 48h o cultivo se mostra na fase estacionária de crescimento. Entretanto, a porcentagem de produção de biomassa do início do cultivo até o fim teve um aumento equivalente a 700%, atingindo uma máxima concentração celular de 9g.L^{-1} em 24h. A fase exponencial de crescimento foi identificada no período de 3 a 24h de cultivo. O consumo do substrato no decorrer do cultivo diminuiu aproximadamente 55% das 0h até 48h de cultivo, obtendo um comportamento semelhante ao do primeiro cultivo.

Figura 13: Perfil cinético da produção de PHB utilizando a glicose como substrato (experimento 2).



Fonte: Autor

No segundo cultivo com glicose os parâmetros de velocidade máxima de crescimento, $\mu_{x \text{ máx}}$, foi estimada em $0,0285 \text{ h}^{-1}$ e tempo de geração durante a fase exponencial de 24,321 h. Para $Y_{X/S}$ foi encontrado o valor de 1,1393 g de célula/g de glicose, com produtividade em células de $0,1595 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Na fase exponencial, a velocidade específica de crescimento é máxima e constante. As velocidades específicas de crescimento celular encontradas nos experimentos com glicose foram semelhantes, assim como os valores de produtividade em biomassa e o fator de conversão de substrato em células.

Tabela 7: Parâmetros cinéticos do experimento 2 com glicose.

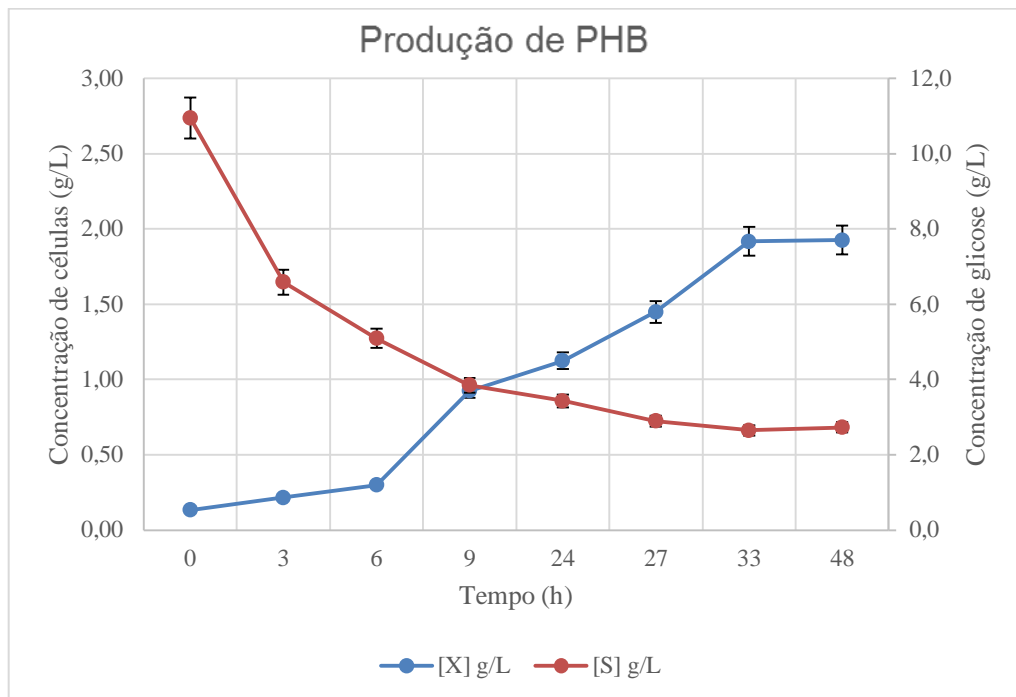
Parâmetros	Valores	Unidades
$\mu_{x \text{ máx}}$	0,0285	h^{-1}
P_x	0,1595	$\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$
$Y_{X/S}$	1,1393	$\text{g}_x.\text{g}_s^{-1}$
t_g	24,321	h

Fonte: Autor

4.2. Cinética de crescimento e consumo de substrato dos experimentos com extrato aquoso de algaroba

O cultivo com o extrato de algaroba apesar de ter apresentado uma biomassa inferior àquela produzida pelo cultivo com glicose, mostrou-se um rendimento superior, onde a produção de biomassa em porcentagem foi de aproximadamente 1384 % do início até o final do cultivo (Figura 14). O consumo do substrato também foi mais bem aproveitado, pois aproximadamente 73% do substrato foram consumidos.

Figura 14: Perfil cinético da produção de PHB utilizando o extrato de algaroba como substrato (experimento 1).



Fonte: Autor

A velocidade máxima de crescimento obteve o valor de $0,0574 \text{ h}^{-1}$ e tempo de geração de $12,076 \text{ h}$, a conversão de substrato em célula, $Y_{X/S}$, foi de $0,2181 \text{ g de célula/g de glicose}$. Em relação à produtividade o valor foi de $0,0373 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

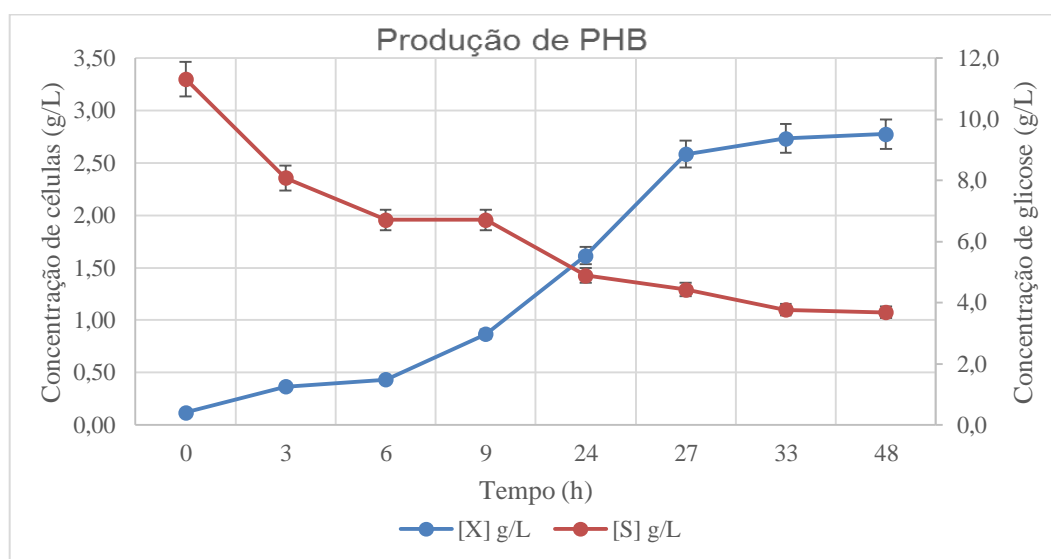
Tabela 8: Parâmetros cinéticos do experimento 1 com algaroba.

Parâmetros	Valores	Unidades
$\mu_x \text{ máx}$	0,0574	h^{-1}
P_x	0,0373	g/L.h
$Y_{X/S}$	0,2181	g_x/g_s
t_g	12,076	h

Fonte: Autor

No segundo cultivo com algaroba, observou-se que a concentração de biomassa foi crescente ao longo das 48h. A porcentagem de crescimento do tempo 0 até 48 h teve um aumento de aproximadamente 2216 %. Atingindo uma concentração máxima de $2,58 \text{ g.L}^{-1}$ em 27 horas de cultivo. O consumo do substrato foi aumentando no decorrer das 48h, conforme observado no gráfico. Neste cultivo, aproximadamente 68% do substrato foi consumido no decorrer das 48h.

Figura 15: Perfil cinético da produção de PHB utilizando o extrato de algaroba como substrato (experimento 2).



Fonte: Autor

As cinéticas dos cultivos com extrato aquoso de algaroba obtiveram resultados semelhantes. No segundo cultivo com algaroba, a velocidade máxima de crescimento máximo, $\mu_{x \text{ máx}}$, obteve o valor de $0,0741 \text{ h}^{-1}$, com tempo de geração de 9,354 h, na conversão de substrato em célula, $Y_{X/S}$, o valor atingido foi de 0,3482. Em relação à produtividade em biomassa foi encontrado o valor de $0,0554 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Tabela 9: Parâmetros cinéticos do experimento 2 com algaroba.

Parâmetros	Valores	Unidades
$\mu_{x \text{ máx}}$	0,0741	h^{-1}
P_x	0,0554	$\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$
$Y_{X/S}$	0,3482	$\text{g}_x.\text{g}_s^{-1}$
t_g	9,354	h

Fonte: Autor

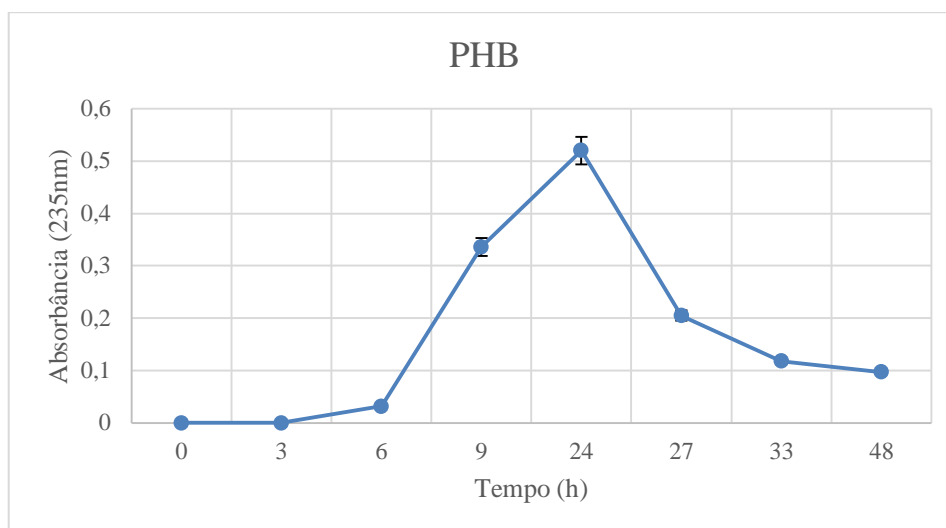
4.3 Indicativos de produção de PHB utilizando glicose como substrato

O indício da presença do PHB foi evidenciado através da turbidimetria em comprimento de onda de 235 nm. Esta análise foi permitida devido à reação proveniente do contato do conteúdo intracelular extraído da biomassa e o ácido sulfúrico. Uma vez que as técnicas de extração e quantificação são específicas para o PHB. Acredita-se que as absorvâncias apresentadas pelo método sugerem a sua presença. Todavia, para quantificação do PHB produzido através da absorvância precisa-se de uma curva padrão com o PHB industrial para obter a concentração do biopolímero nesse processo.

O que se pode observar nos dois gráficos (Figura 16 e 17), que entre o período de 0h a 6h não teve absorvância significativa, o que pode indicar a não formação dos grânulos do biopolímero durante as primeiras 6 horas de cultivo. A partir das 9h de cultivo, apresentaram valores significativos para ambos experimentos. Nos experimentos com glicose, o ponto máximo de produção ocorre com 24h e logo em seguida houve um declínio.

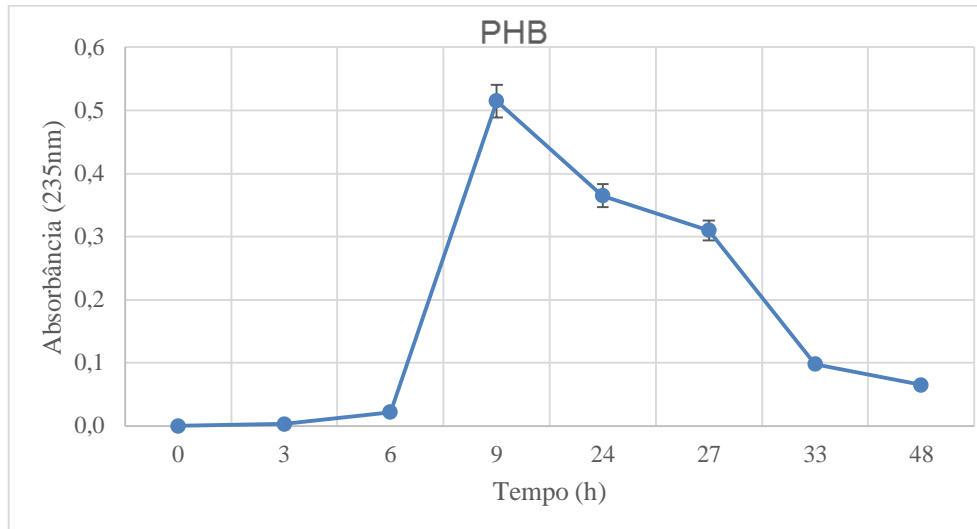
As curvas apresentadas são características do processo de produção de biopolímero, o que reforça que a quantificação seja de fato do biopolímero, já que a produção de PHB é associada ao crescimento microbiano.

Figura 16: Indicativo de produção de PHB do primeiro cultivo com glicose.



Fonte: Autor

Figura 17: Indicativo de produção de PHB do Segundo cultivo com glicose.



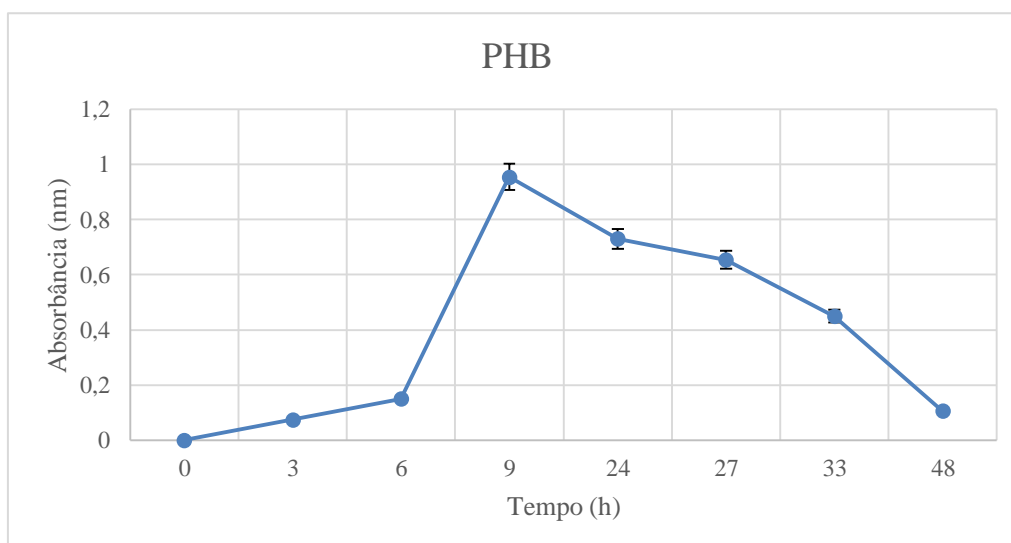
Fonte: Autor

4.4. Indicativo de produção de PHB utilizando extrato de algaroba como substrato.

Os resultados encontrados no experimento com algaroba (Figuras 18 e 19) mostraram aspectos similares ao da glicose, mas tendo como diferença uma quantificação crescente da produção de biopolímero, porém menos intensa nos pontos de 0 a 6 h. O ponto máximo quantificado foi com 9h de cultivo, embora que entre 24 e 27h os valores se mostraram constantes, ocorrendo um decréscimo a partir das 27h.

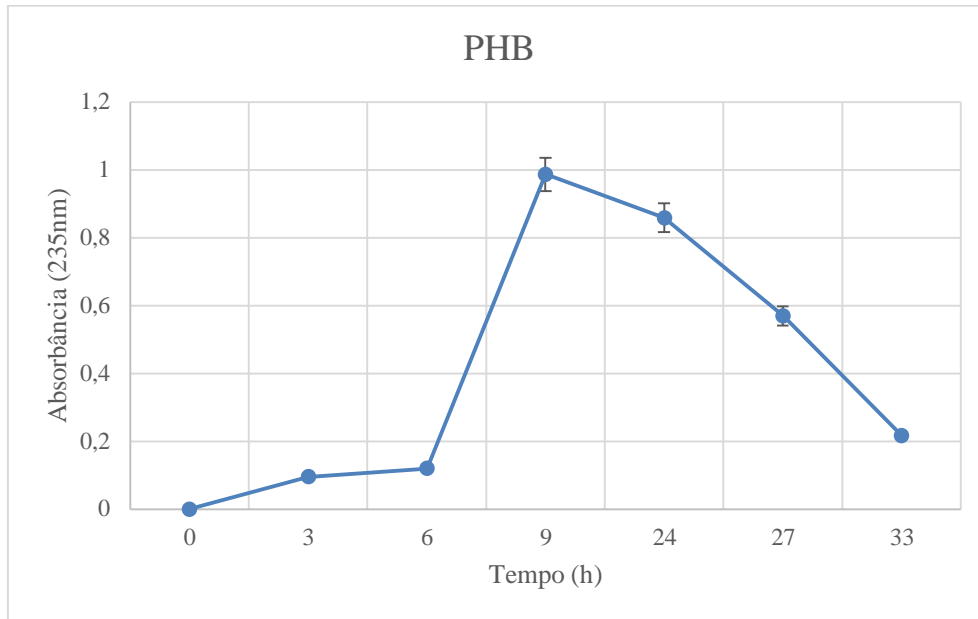
Além de tudo, os valores de absorbância encontrados nos experimentos com algaroba foram superiores em todos os pontos quando comparado aos cultivos com glicose.

Figura 18: Indicativo de produção de PHB do primeiro cultivo com algaroba.



Fonte: Autor

Figura 19: Indicativo de produção de PHB do segundo cultivo com algaroba.



Fonte: Autor

5. DISCUSSÃO

A cinética entre os cultivos com glicose e extrato de algaroba, mostrou que apesar da concentração das células ser maior nos experimentos com glicose a algaroba fica à frente na velocidade específica máxima e no tempo de geração de células, portanto, possui um melhor aproveitamento do substrato disponível. Em ambos os experimentos, foi notado uma diminuição na quantidade de biopolímero associado com a diminuição da produtividade.

Em Rodrigues et al. (2004), observaram a cinética de crescimento nos experimentos para produção de polímero por *Ralstonia eutropha* utilizando resíduo da indústria de arroz como fonte de carbono, obtiveram uma produtividade de $0,17 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Valor semelhante ao encontrado neste trabalho pelo cultivo com glicose, após a diminuição da produtividade de biomassa também foi identificado uma diminuição na quantidade de P(3HB).

Já foi relatado que os picos de síntese do PHB podem estar em 24, 48, 72 e 120 h. Porém, em experimentos com *Bacillus* é observada a máxima produção de PHB antes das 48h de cultivo (NAZAN TAMDOĞAN E UĞUR SIDAL, 2011).

Luvizetto et al. (2007), em sua pesquisa, com o cultivo de *B. megaterium* como produtor de biopolímero poli(3-hidroxi-butarato) utilizando sacarose como fonte de carbono, identificaram um acúmulo de 75% de P(3HB) durante 20h de cultivo, apresentando um

crecente consumo de P(3HB) após esse período . O trabalho ainda relatou que a produção é relacionada com o crescimento e não com a limitação de nutrientes como antes se pensava.

McCool et al. (1996) também observaram em seus estudos com diferentes substratos para a produção de PHB por *Bacillus* que a maior concentração do polímero é na fase *lag* e estacionária de crescimento ocorrendo uma gradativa diminuição no final da fase estacionária.

Durante 48 h de incubação a 30°C, utilizando xarope e melão de beterraba para investigar se a fermentação se *B. megaterium* produzem altos rendimentos de PHB, Omar et al. (2001) obtiveram como resultados uma produção crescente até 14h de cultivo. Após 22h, já foi observado um declínio na produção.

O gênero *Bacillus* vem revelando diferentes espécies com grande potencial na produção de biopolímero e com grandes chances de estar entre os maiores produtores de PHB. Também foi mostrado que as linhagens de *Bacillus* podem ser capazes de produzir biopolímero a partir de glicose, extratos orgânicos e resíduos.

6. CONCLUSÕES

Os experimentos obtiveram comportamentos semelhantes, para a cinética de crescimento, consumo de substrato e cinética de produção do biopolímero. O que garantiu uma maior confiança nos resultados obtidos.

Bacillus sp. e os substratos analisados mostraram-se como potenciais produtores de biopolímero do tipo PHA – PHB.

Os experimentos que utilizaram extrato de algaroba sugerem uma maior produção de biopolímero, concluindo que a algaroba é um substrato em potencial.

Alguns estudos ainda precisam ser feitos para confirmar os resultados apresentados neste trabalho.

REFERENCIAS

- ASLIM, Belma; YUKSEKDAG, Zn; BEYATLI, Yavuz. Determination of the PHB growth rates of certain *Bacillus* species isolated from soil. **Turkish Electronic Journal of Biotechnology**, p. 24-30, 2002.
- BARROS, N.A.M.T. de. Efeito da substituição progressiva do melão por vagens de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw) DC) na alimentação de ruminantes. 1981a. 97 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - **Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba**. Areia. 1981.
- BERWIG, Karina Hammel. Produção bacteriana de poli (3-hidroxi-butirato) a partir de lactose e soro de leite. 2016. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, **Universidade de Caxias do Sul**. Caxias do Sul.
- BHUWAL, Anish Kumari et al. Poli- β -hidroxi-butirato produção e gestão de efluentes da indústria de papelão pelo novo *Bacillus* sp. NA10. **Bioresources e Bioprocessamento**, v. 1, n. 1, p. 1 de 2014.
- BIOCYCLE, A PHB Industrial S.A. Disponível em : < <http://www.biocycle.com.br/site.htm> > Acesso em : 25 de Outubro de 2016.
- BRITO, G. F. et al. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 6, n. 2, p. 127-139, 2011.
- CHANPRATEEP, Suchada. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 621-632, 2010.
- CHEN, Guo-Qiang; WANG, Yang. Aplicações médicas de biopolyesters polihidroxi-alcenoatos. **Chinese Journal of Polymer Science**, v. 31, p. 719-736, 2013.
- COUTINHO, B. C., MIRANDA, G. B., SAMPAIO, G. R., SOUZA, L. B. S. D., SANTANA, W. J., & COUTINHO, H. D. M. A Importância e as Vantagens do Poli-hidroxi-butirato (Plástico Biodegradável). **Holos**, 3, 5.2004.
- COUTINHO, B. C., MIRANDA, G. B., SAMPAIO, G. R., DE SOUZA, L. B. S., SANTANA, W. J., & COUTINHO, H. D. M. A importância e as vantagens do polihidroxi-butirato (plástico biodegradável). **Holos**, 3, 76-81.2007

CORRÊA, Henrique Leonardo Ruchaud. Estudo do metabolismo de polihidroxibutirato em *Herba spirillum seropedicae*. 2014. Monografia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

Del Valle, F.R.; Escobebo, M.; Munoz, M.J.; Ortega, R; Bourges, H. Chemical and nutritional studies on mesquite beans *Prosopis juliflora* (SW) D.C., **Journal of Food Science**, v.48,p.914-919, 1983.

FACCIN, Debora Jung Luvizetto. Avaliação de condições de cultivo para aumento da produção de P (3HB) por *Bacillus megaterium* e modelagem do bioprocesso. 2012. Dissertação (Doutorado) - **Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

FRANCHETTI, Sandra Mara M; MARCONATO, JC. Polímeros biodegradáveis-uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 811, 2006.

FLIEGER, M. et all. Plásticos biodegradáveis a partir de fontes renováveis. **Folia microbiológica**, v. 48, n. 1, p. 27-44, 2003.

FONSECA, camila chuluck. Produção e utilização do biopolímero poli (hidroxibutirato) (phb) em embalagens alimentícias. 2014. Trabalho de conclusão de curso. **Graduação do Curso de Engenharia Lorena** - Universidade de São Paulo. Lorena.

GALÁN, Abel González. Estudo da farinha e da goma de algaroba (*Prosopis* spp.). 2014. Dissertação (Doutorado). **Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos**. Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais.

GHANBARZADEH, B.; ALMASI, H. Biodegradable Polymers Biodegradation - Life of Science, CHAMY, Dr. R. (Ed.), ISBN: 978-953-51-1154-2, **InTech**, jun. 2013. DOI: 10.5772/56230. Disponível em: < <http://www.intechopen.com/books/biodegradation-life-of-science/biodegradablepolymers> > Acesso em: 08/10/2016.

GLANERT, Ana Cláudia Cristófoli. Produção de P (3HB) por *Bacillus megaterium* a partir de hidrolisado de casca de soja. 2015. Monografia. **Graduação de Engenharia Química**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

GOMES, Marcos JP; HEMÁTICO, Carbúnculo; ALIMENTARES, Intoxicações. Gênero *Bacillus* spp. **Disciplina de microbiologia clínica veterinária**. 2013.

GOMES, R.P. Forragens fartas na seca. 2ª ed., São Paulo: **Editores Nobel**, 1973. 236f.

GRADOS, N.Y.G. CRUZ, La Algarroba: Perspectivas de Utilización Industrial. Serie de Química. **Universidad de Piura**. Piura, Peru, 1996. 2: 22f. (Série de Química).

HÖLKER, Udo; LENZ, Jürgen. Solid-state fermentation are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301-306, 2005.

INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM. Banco de Dados. Disponível em: <<http://www.itis.gov/>>. Acesso em: 30 de outubro de 2016.

JAIN, Abhiney; MORLOK, Charles K.; HENSON, J. Michael. Comparison of solid-state and submerged-state fermentation for the bioprocessing of switchgrass to ethanol and acetate by *Clostridium phytofermentans*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 905-917, 2013.

KRUEGER, Cristhiane Leite et al. Seleção de linhagens de *Bacillus* produtoras de polihidroxicanoatos a partir de resíduo do processamento de mandioca. 2009.Dissertação(Mestrado) - **Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade**, Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

LAVORATO, Gilka Cunha. Prospecção de micro-organismos produtores de polihidroxicanoatos (PHAs) com ênfase em *Chromobacterium violaceum*, isolados do Parque Nacional da Serra do Cipó (MG),2008.

LAW, K.H.; CHENG, Y.C.; LEUNG, Y.C.; LO, W.H.; CHUA, H.; YU, H.F. Construction of recombinant *Bacillus subtilis* strains for polyhydroxyalkanoates synthesis. **Biochemical Engineering Journal**, 16, p. 203-208, 2003

LIMA. D.F. Avaliação nutricional e bioquímica de *Prosopis juliflora* e seu aproveitamento na Referências Bibliográficas 174 alimentação humana. In: Simpósio Brasileiro sobre algaroba, 2,Mossoró, RN,Brasil.**Coleção Mossoroense**. n. 357. f. 61-65. 1987.

LIMA, Helder Levi Silva. Avaliação do potencial do líquido de sisal e do suco de caju para a produção de celulose bacteriana. **VII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio**. 2014.

LUCKACHAN, Gisha E.; PILLAI, CKS Polímeros Biodegradáveis-um comentário sobre as tendências recentes e perspectivas emergentes. **Journal of Polymers e Meio Ambiente** , v. 19, n. 3, p. 637-676, 2011.

LUVIZETTO, Débora Jung. Cultivo da bactéria *Bacillus megaterium* para a produção do biopolímero poli (3-hidroxibutirato) e modelagem matemática do bioprocesso. 2007. Dissertação (Mestrado) – **Programa de pós Graduação em Engenharia Química**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

MACEDO, Maria João Mano Fernandes. Produção de bioplásticos a partir de agro-resíduos. 2015. Dissertação (Mestrado) - **Pós em Engenharia de Materiais**, Universidade do Minho Escola de Engenharia.

McCool, Gabriel J. et al. Crescimento inclusão de corpo polihidroxialcanoatos e proliferação de *Bacillus megaterium*. **Letras FEMS microbiologia**, v. 138, n. 1, p. 41-48, 1996.

MIRA, Elciane O. A utilização da algaroba como alternativa de desenvolvimento socioeconômico do semi-árido baiano. 2001. Monografia. **Curso de Graduação da Faculdade de Ciências Econômicas**, Universidade Federal da Bahia, Salvador-Bahia.

MONOD, Jacques. The growth of bacterial cultures. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 371-394, 1949.

NATH, A.; DIXIT, M.; BANDIYA, A.; CHAVDA, S.; DESAI, A.J. Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *methylobacterium* sp. ZP24. **Bioresource Technology**, n.99, p.5749–5755, 2008.

OMAR, S. et al. Otimização do crescimento celular e poli (3-hidroxibutirato) acumulação de xarope de data por uma estirpe *Bacillus megaterium*. **Biotechnology Letters** , v. 23, n. 14, p. 1119-1123, 2001.

ORTEGA FILHO, S. O potencial da agroindústria canavieira do Brasil. **Faculdade de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, dez. 2006. Disponível em: Acesso em: 18 set. 2016.

PANDA, B., JAIN, P., SHARMA, L., MALLICK, N. Optimization of cultural and nutritional conditions for accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Biores Technol.** 97: 1296-1301, 2006.

PEÑA C, CASTILLO T, GARCÍA A, MILLÁN M, SEGURA D .Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work. **Microb Biotechnol** 7:278–293. 2014.

PORRAS, Mauricio, A. Production of polyhydroxybutyrate using bacterial strains of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*: a comparison. 2015.

PRADELLA, J. G. C. Biopolímeros e Intermediários Químicos. Subsídios para Elaboração da Política de Biotecnologia Industrial no Brasil. **Centro de Tecnologia de Processos e Produtos**. São Paulo.2006.

Prasanna, T., Babu, P.A., Lakshmi, P.D., Chakrapani, R., Rao, C.S.V.R. Production of Poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus* species isolated from soil. **J. Pharma Res. Rev.** 1:15-18.2011.

REDDY CSK, GHAI R, RASHMI, KALIA VC. Poliídrolcancanoatos: uma visão geral Biores Technol; 87 : 137-146. doi:. 10.1016 / S0960-8524 (02) 00212-2.2003.

REGULY, J. C. Biotecnologia dos Produtos Industriais–Fermentações Industriais, Biomassa Celular. v. 2. **Editora e Gráfica Universitária–UFPel**, Pelotas-PR, 1998.

RIBEIRO, Paulo Leonardo; DRUZIAN, Janice Izabel. Monitoriamento do processo de produção do phb. **GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 3, n. 2, p. 195-204, 2013.

RODRIGUES, A. D. Estudo da Produção de Polihidroxibutirato por *Cupriavidus necator* em fermentação no estado sólido. 2005. XI, 86 p. (COPPE/UFRJ, M.Sc., Engenharia Química, 2005) Dissertação (Mestrado em Ciências) – **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 2005.

Rodrigues, R. C., Fiorese, M. L., Arnosti, E. P., Ramos, R. A., Pezzin, A. P. T., & Aragão, G. M. Produção e Caracterização de Poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por *Ralstonia eutropha* Utilizando Resíduo da Indústria de Arroz. **Revista Matéria**, 9(4), 378-385.2004

ROSSA, LÍlian Vanessa. Avaliação das propriedades de compósitos de poli (hidroxibutirato-co-valerato) reforçado com fibras de curauá. 2014.Dissertação(Mestrado) - **Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias** , Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul.

SANTOS, D. P.; PINTO, JCCS; ALVES, TLM. Produção de Poli (hidroxialcancanoatos) a partir de Glicerol. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011.

SCHMIDELL, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., & BORZAMI, W. Agitação e aeração em biorreatores. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**, 2001

SERAFIM¹, Luísa S.; LEMOS¹, Paulo C.; REIS¹, Maria AM. Produção de Bioplásticos por Culturas Microbianas Mistas. 2003.

SHAH, KR Optimization e produção de Polyhydroxybutarate (PHB) por *Bacillus subtilis* G1S1 from solo. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* , v. 3, n. 5, p. 377-387, 2014.

SHAHID, S., MOSRATI, R., LEDAUPHIN, J., AMIEL, C., FONTAINE, P., GAILLARD, J. L., CORROLER, D. Impact of carbon source and variable nitrogen conditions on bacterial biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: evidence of an atypical metabolism in *Bacillus megaterium* DSM 509. *J. Biosci. Bioeng*, 116(3):302-308.2013.

SLEPECKY, Ralph A.; LAW, John H. A rapid spectrophotometric assay of alpha, beta-unsaturated acids and beta-hydroxy acids. *Analytical chemistry*, v. 32, n. 12, p. 1697-1699, 1960.

SILVA, C. G. Otimização do Processo de Produção da Aguardente de Algaroba e Aproveitamento dos Resíduos Sólidos em Produtos Alimentares. 2009. Dissertação (Doutorado). **Universidade Federal de Campina Grande**. Campina Grande.

SINGH, Akhilesh K; MALLICK, Nirupama. Sistema biológico AS REATOR PARA A PRODUÇÃO DE BIODEGRADÁVEIS termoplásticos, Poliidroxicanoatos. *Biociencia Industrial: Produção Sustentável e Utilização, Bioresource* p. 281, de 2016.

SINGH, G., KUMARI, A., MITTAL, A., YADAV, A.. Poly β -hydroxybutyrate production by *Bacillus subtilis* NG220 using sugar industry waste water. *BioMed research international*, v. 2013, 2013.

Singh, Akhilesh Kumar; Mallick, Nirupama. Sistema biológico AS REATOR PARA A PRODUÇÃO DE BIODEGRADÁVEIS termoplásticos, Poliidroxicanoatos. **Biociencia Industrial: Produção Sustentável e Utilização, Bioresource**, p. 281, de 2016.

SONG, J. H., Murphy, R. J., Narayan, R., & Davies, G. B. H. Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 364, n. 1526, p. 2127-2139, 2009.

SQUIO, Cláudia Regina; ARAGÃO, Gláucia MF. Estratégias de cultivo para produção dos plásticos biodegradáveis poli (3-hidroxiacetato) e poli (3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato) por bactérias. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 615-622, 2004.

STEINBÜNCHEL, A.; FÜNCHTENBUSCH, B.; Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends in Biotechnology*. v. 16, p.419-427, 1998.

TAMDOĞAN, Nazan; SIDAL, Uğur. Investigation of poly- β -Hydroxybutyrate (PHB) production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 under different conditions. **Kafkas Univ Vet Fak Derg**, v. 17, n. Suppl A, p. 173-176, 2011.

VALDÍVIA, S.V. El algaroba, uma espécie florestal prometedora para los trópicos áridos. **Ministério da Agricultura**. Peru. 1972. 19f. (Boletim de Divulgação, 32).

VANZIN, César. Estudo da biossíntese de Poli-3-Hidroxibutirato-co-Hidroxialcanoatos de Cadeia Média (P3HB-co-3HAMcl) a partir de ácidos graxos livres e óleo vegetal. 2008. Tese de Doutorado. **Instituto Butantan**.

VIEGAS, C. P. R. Estudo da Produção de Polihidroxialcanoatos (PHAs) por *Chromobacterium violaceum*, out. 2005, 85f., Dissertação (Mestrado) - **Pós em Engenharia de Alimento**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

VIVEIRO IPÊ. Mudas. Disponível em: < http://www.viveiroipe.com.br/?page_id=6 >. Acesso em : 15/10/2016

WU, F.C.; TSENG, R.L.; JUANG, R.S. Kinetic modeling of liquid-phase adsorption of reactive dye and metal ions on chitosan. **Water Research**, v.35, n.3, p.613-618, 2001.

YILMAZ, Mirac; SORAN, Haluk; BEYATLI, Yavuz. Determinação de poli- β -hidroxibutirato de produção (PHB) por alguns *Bacillus* spp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 565-566, 2005.

ZINN, M., WITHOLT, B., EGLI, T., Occurrence synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. **Advanced Drug Delivery Reviews** , v. 53, pp. 5 – 21.2001.

ANEXO

