

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

Produção de PHA por Cultivos Mistos

Cristiane dos Santos

Tese de Doutorado

Porto Alegre, Fevereiro de 2021.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

Produção de PHA por Cultivos Mistos

Cristiane dos Santos

Tese realizada sob a orientação do Prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos e coorientação do Prof. Dr. Adriano Brandelli, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciência dos Materiais

Porto Alegre, Fevereiro de 2021.

*“A Força não provém da capacidade física,
mas da vontade férrea.”*

Mahatma Gandhi

*Ao meu marido Mark pelo apoio e amor incondicionais
e meus filhos Augusto, Anauã e Alexandre pela motivação e inspiração.*

Agradecimentos

Ao *Professor Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos* pelo apoio, paciência e motivação para a realização deste trabalho, pelo seu desprendimento e comprometimento demonstrando de forma plena o verdadeiro significado da palavra orientação. Ao *Professor Dr. Adriano Brandelli* pela coorientação, incentivo e espaço disponibilizados em seu laboratório.

A Comissão Examinadora pelos questionamentos e contribuições apresentadas durante a Defesa: *Dr. Fernando Silveira* – BRASKEM, *Dr. Robson Pablo Sobradie* Peguin – BRASKEM, e *Professor Dr. Johnny Ferraz Dias* – PGCIMAT/UFRGS.

Aos técnicos do Instituto de Química/UFRGS pelo auxílio no preparo de amostras e análises de dados: Msc. Alan dos Santos Silva (SAXS/DLS), Msc. Gabriela Negrini Wentz (RMN), Dra. Fabiana Nogueira Grosser (MALDI TOF MS e GPC), Joyce Cristina E. Martins (RMN ^1H e ^{13}C), Dr. Julio Cesar P. Vagheti (LAMAT) e Dra. Larissa R. Rodrigues (CHN).

A Professora *Dra. Griselda Ligia Barrera de Galland* pela disponibilidade e ajuda na interpretação de inúmeros espectros de RMN e convívio diário no Prédio K.

Aos meus amigos Prof. *Dr. Carlos Thomas* e o técnico Batista da Escola de Engenharia/UFRGS pelo apoio e ideias na solução de problemas de escalonamento.

Ao INCT-MIDAS e Laboratório de Negócios Midas que ampliou as perspectivas do trabalho realizado viabilizando a criação de um *Start up* e inserção no mercado.

Ao grupo de trabalho e amigos do Laboratório de Catálise e Polímeros K106 onde a união, amizade e parceria primaram pelo senso da coletividade.

Aos meus amigos e equipe de apoio do SAMU (*Somente o Álcool Movimenta o Universo*), pela parceria, conselhos e diversão nos períodos mais críticos desta jornada.

Sumário

Declaração de autoria	ii
Dedicatória	iii
Agradecimentos	iv
Sumário	v
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xiv
Resumo	xv
Abstract	xvi
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3 OBJETIVO GERAL	36
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4 PARTE EXPERIMENTAL	37
4.1 Resíduos Agroindustriais.....	38
4.2 Microrganismos	39
4.3 Cultivo e Manutenção dos Microrganismos	40
4.4 Preparo dos Meios de Cultivo Líquido – Hidrólise	42
4.5 Preparo dos Meios de Cultivo Sólido	44
4.6 Cultivo dos Microrganismos em Meio Líquido	45
4.7 Cultivo em Biorreator	48
4.8 Extração e Purificação dos Biopolímeros	50
4.9 Técnicas de Caracterização	52
4.9.1 Carbono Fixo, Voláteis e Teor de Cinzas	52
4.9.2 Análise Elementar (CHN)	52
4.9.3 Análise Termogravimétrica (TGA)	52

4.9.4	Adsorção de Nitrogênio (BET).....	53
4.9.5	Espalhamento de Raios X a baixos ângulos (SAXS)	53
4.9.6	Espectroscopia no Infravermelho (FTIR).....	53
4.10	Composição dos Meios de Cultivo.....	54
4.10.1	Teor de Lignina Solúvel	54
4.10.2	Açúcares Redutores Totais	54
4.10.3	Carbono Orgânico e Nitrogênio Total	54
4.11	Biomassa Microbiana	55
4.12	Microscopia Óptica	55
4.13	Cromatografia por Permeação em Gel (GPC).....	55
4.14	Análises Térmicas (TGA e DSC).....	56
4.15	Espectrometria de Massa (MALDI TOF MS).....	56
4.16	Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹ H e RMN ¹³ C).....	56
4.17	Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CSLM)	57
4.18	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	57
4.19	Perfilometria Óptica	57
4.20	Ângulo de Contato	58
4.21	Propriedades Físicas (Tensão x Deformação)	58
4.22	Toxicidade em Células de mamíferos	58
4.23	Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	60
4.24	Ensaio de Biodegradação	60
4.24.1	Teste abiótico por Intemperismo Natural	60
4.24.2	Teste de Biodegradação em Meio Aquoso (mg _{CO2}).....	61
4.24.3	Teste de Biodegradação Biótico em Solo.....	63
4.24.4	Avaliação de Toxicidade no Crescimento e Germinação de Sementes	63
4.25	Análise Estatística	64
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65

5.1	Caracterização da biomassa agroindustrial e meios de cultivo	65
5.2	Crescimento dos Microrganismos em Meio Sólido	74
5.3	Crescimento dos Microrganismos em Meio Líquido	76
5.4	Caracterização dos Biopolímeros	81
5.4.1	PHA 1 – P(3HB)	84
5.4.2	PHA 2 – P(3HP)	88
5.4.3	PHA 3 – P(3HBcoHP)	94
5.4.4	PHA 4 – P(3HBcoHV)	98
5.4.5	PHA 5 – P(3HFB)	101
5.5	Escalonamento em Biorreator de 35 L	106
5.6	Caracterização dos Grânulos de PHA	108
5.7	Ensaio de Citotoxicidade	111
5.8	Caracterização de filmes de PHA e Blendas com PLA	113
5.9	Ensaio de Biodegradação dos Filmes	120
5.9.1	Ensaio abiótico por intemperismo natural	120
5.9.2	Ensaio de biodegradação em meio aquoso (mg _{CO2})	125
5.9.3	Ensaio de Biodegradação em Solo	126
5.9.4	Avaliação de toxicidade crescimento e germinação de sementes	131
6	POTENCIAL APLICAÇÃO BIOECONÔMICA	135
7	CONCLUSÕES	137
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139

APÊNDICES

APÊNDICE A - CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA AGROINDUSTRIAL

A1	TGA - Termogramas obtidos das biomassas agroindustriais	151
A2	ATR - Espectro de infravermelho em modo ATR	152
A3	FTIR - Espectros de infravermelho (FTIR) das biomassas agroindustriais	153
A4	BET - Isotermas obtidas por Adsorção de nitrogênio	154
A5	SAXS - Análises por espalhamento de Raios-X a baixos ângulos	155

APÊNDICE B – CULTIVOS DOS MICRORGANISMOS

B1	Imagens dos cultivos em meio sólido das diferentes biomassas	156
B2	Etapas de cultivo em meio líquido (250 mL)	157
B3	Cultivos em biorreator de 2 L e 35 L	158

APÊNDICE C – CURVAS DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS

C1	Curvas de crescimento de <i>Bacillus subtilis</i> em meios hidrolisados ácidos	159
C2	Curvas de crescimento de <i>Bacillus cereus</i> em meios hidrolisados ácidos	160
C3	Curvas de crescimento de <i>Bacillus licheniformis</i> em meios hidrolisados ácidos	161
C4	Curvas de crescimento de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> em meios hidrolisados ácidos	162

APÊNDICE D – ÍNDICE DE CARBONILA (IC)

D1	Início e após 180 dias: PLA, P3HB, P3HP, P3HBcoHP	163
D2	Início e após 180 dias: P3HBcoHV, P3HFB, PLA+P3HB, PLA+P3HP	164
D3	Início e após 180 dias: PLA+P3HBcoHP, PLA+P3HBcoHV, PLA+P3HFB	165

ANEXOS

I	Exemplos de Monômeros de PHA Sintetizados por Bactérias	166
II	Principais Rotas Metabólicas para produção de PHA por Bactérias	169
III	Comparação de Diferentes Métodos de Extração de PHA	172
IV	Dados INMET: Temperatura, Umidade, Chuva acumulada e Radiação (Nov/2018 até Mai/2019)	174

Lista de Figuras

Figura 1	Estrutura geral de PHAs	18
Figura 2	(a) Imagem de micrografia eletrônica de transmissão de grânulos de P3HB acumulados em <i>Burkholderia</i> sp. após 48 h de cultivo (b) Estrutura do grânulo de PHB modificado de Bresan	23
Figura 3	Exemplos de alguns monômeros detectados em PHAs sintetizados por bactérias. Compilado a partir de Steinbüchel e Valentin	27
Figura 4	Esquema 1 Resumo das principais etapas realizadas neste estudo	37
Figura 5	Esquema 2 Etapas para cultivo e manutenção dos microrganismos	40
Figura 6	Esquema 3 Preparo da biomassa para obtenção dos meios hidrolisados	42
Figura 7	Esquema 4 Cultivo de microrganismos em meio sólido	44
Figura 8	Esquema 5 Etapas para o cultivo de microrganismos em meio líquido	45
Figura 9	Esquema 6 Etapas para o cultivo em Biorreator	48
Figura 10	Esquema 7 (a) Etapas para extração e purificação do PHA com hipoclorito de sódio e acetona e (b) extração com carbonato de polipropileno	50
Figura 11	Dendrograma gerado das variáveis das composições elementares, texturais, lignina solúvel e insolúvel, frações de carbono e açúcares totais após hidrólise dos resíduos: AC (Casca de Acácia), PE (Pele de Amendoim), AR (Casca de Arroz), BA (Casca de Banana), CA (Bagaço de Cana), CO (Fibra de Coco), TO (Talo de Fumo) e TR (Farelo de Trigo)	72
Figura 12	Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das biomassas agroindustriais puras e após hidrólise ácida: (a) Farelo de trigo, (b) Resíduo hidrolisado de farelo de trigo, (c) Talo de fumo, (d) Resíduo hidrolisado de talo de fumo, (e) Pele de amendoim e (f) Resíduo hidrolisado de pele de amendoim.	73
Figura 13	(A) Imagem da placa de Petri após cultura em meio de pele de amendoim hidrolisado, no sentido anti-horário: <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> e <i>B. cereus</i> ; (B) Imagem de microscopia óptica dos grânulos de PHA corados em azul em cultivo do meio hidrolisado da pele de amendoim com <i>B. amyloliquefaciens</i> ; (C) Micrografia confocal de fluorescência do polímero acumulado nas células; (D) Micrografia eletrônica de varredura mostrando a morfologia das células com grânulos de PHA acumulado.	75
Figura 14	Relação entre densidade celular (OD600) e o tempo de cultivo de <i>Bacillus licheniformis</i> em meio de farelo de trigo (TR) hidrolisado ácido e no detalhe o cálculo de $\mu_{m\acute{a}x}$.	77

Figura 15	CDW: massa celular seca (g.L ⁻¹), PHA extraído (g.L ⁻¹) e % PHA extraído após 48 h de cultivo em biorreator de 250 mL	80
Figura 16	CDW: massa celular seca (g.L ⁻¹), PHA extraído (g.L ⁻¹) e % PHA extraído após 48 h de cultivo em biorreator de 2 L	82
Figura 17	Espectros de infravermelho (a) FTIR e (b) ATR do PHA obtido do cultivo com <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> em meio HA_CA	85
Figura 18	(a) Espectro RMN ¹ H e (b) Espectro RMN ¹³ C do PHA obtido em meio de cultivo HA_CA com <i>B. amyloliquefaciens</i>	86
Figura 19	Espectro MALDI TOF MS dos oligômeros de PHA em modo refletor positivo no fragmento entre m/z = 1000-1750, no detalhe a estrutura sugerida de P(3HB)	87
Figura 20	Curvas de DSC (a) e TGA (b) obtidos do PHA em meio de cultivo de farelo de trigo com <i>B. amyloliquefaciens</i>	87
Figura 21	Espectros de infravermelho (a) FTIR e (b) ATR do PHA obtido do cultivo com <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> em meio HA_PE	89
Figura 22	(a) Espectro RMN ¹ H e (b) Espectro RMN ¹³ C do PHA obtido em meio de cultivo HA_PE com <i>B. amyloliquefaciens</i> .	90
Figura 23	Espectro MALDI TOF MS dos oligômeros de PHA em modo refletor positivo no fragmento entre m/z = 800-1750. No detalhe, a estrutura sugerida de P(3HP)	91
Figura 24	Curvas de DSC (a) e TG (b) obtidos do P3HP em meio de cultivo de pele de amendoim com <i>B. amyloliquefaciens</i>	92
Figura 25	Esquema Três vias metabólicas envolvidas na síntese do PHA utilizadas por bactérias para criar precursores de PHA. A via I é predominantemente usada em organismos produtores de PHB, enquanto as vias II e III estão presentes nas bactérias, produtoras de mcl-PHA. As enzimas são indicadas, adjacentes às setas; processos envolvendo muitas etapas são indicados por retângulos arredondados: Glicólise, a via de Entner-Doudoroff (E-D), bem como os ciclos de oxidação β e biossíntese de ácidos graxos. Os PHAs produzidos são indicados com a estrutura química do monômero PHA resultante.	93
Figura 26	(a) Espectro RMN ¹ H e (b) Espectro RMN ¹³ C do PHA obtido em meio de cultivo HA_TR+PE com <i>B. amyloliquefaciens</i> .	95
Figura 27	Espectro MALDI TOF MS do PHA em modo refletor positivo no fragmento entre m/z = 600-1600. No detalhe, a estrutura sugerida do copolímero P3HBcoHP	96
Figura 28	Curvas de DSC (a) e TG (b) obtidas do P3HBcoHP	97

- Figura 29** (a) Espectro RMN ^1H e (b) Espectro RMN ^{13}C do PHA obtido em meio de cultivo HA_CA+TR com *B. amyloliquefaciens*. 99
- Figura 30** (a) Espectro MALDI TOF MS do PHA em modo refletor positivo entre 30- 100 140 kDa, (b) expansão do fragmento entre $m/z = 71000-74000$. No detalhe, a estrutura sugerida do copolímero P3HBco3HV
- Figura 31** Curvas DSC (a) e TG (b) obtidas do P3HBcoHV do cultivo misto de bagaço 101 de cana e farelo de trigo com *B. amyloliquefaciens*
- Figura 32** (a) Espectro RMN ^1H e (b) Espectro RMN ^{13}C do P3HFB obtido em meio de 103 cultivo HA_PE+CA+TR com *B. licheniformis*
- Figura 33** Espectro RMN ^{13}C do PHA em forma sólida, no detalhe a estrutura 103 sugerida de poli 3-hidroxi-fenil-butirato: P3HFB
- Figura 34** (a) Espectro MALDI TOF MS do PHA em modo linear refletor positivo de 30 104 a 210 kDa, no detalhe, a estrutura sugerida do biopolímero P3HFB e (b) expansão do fragmento entre $m/z = 59000$ e 60500.
- Figura 35** Curvas DSC (a) e TG (b) obtidas do P3HFB do cultivo misto de pele de 105 amendoim, bagaço de cana e farelo de trigo com *B. licheniformis*
- Figura 36** Ensaio em biorreator de 35 L: consumo de carbono orgânico total, 106 biomassa celular total, PHA extraído, biomassa residual, em cultivo com hidrolisado ácido de farelo de trigo e pele de amendoim com *Bacillus amyloliquefaciens*
- Figura 37** (a) Imagem de microscopia eletrônica de grânulos de PHA acumulados em 109 célula bacteriana (Fonte: <https://lipidlibrary.aocs.org>); (b) PHA em pó após extração; (c) Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura do PHA extraído com hipoclorito de sódio e precipitado com acetona e (d) Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura do PHA extraído com carbonato de polipropileno.
- Figura 38** (a) Curva de SAXS da amostra de P3HB com os valores de q obtidos e (b) 111 Distribuição dos tamanhos de partículas nos três níveis de organização, no destaque: diferentes níveis de organização das partículas.
- Figura 39** Viabilidade celular de células MRC5 após tratamento com PHBcoHP. As 112 células foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de atmosfera de CO_2 na presença de PHA nas concentrações de 1, 10, 100, 500 e $1000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A percentagem de células viáveis foi determinada por ensaio de absorção de vermelho neutro. O controle sem adição de PHA foi definido como 100%. Cada barra representa a média \pm DP de três experiências independentes.
- Figura 40** Filmes obtidos dos homopolímeros: PLA, P3HB, P3HFB, copolímeros: 113 P3HBco3HP e P3HBco3HV e em misturas com PLA (1:1)
- Figura 41** Curvas de tensão x deformação em ensaios de tração dos PHAs e PLA 114

- Figura 42** Curvas de tensão *versus* deformação em ensaios de tração dos filmes 116 obtidos da mistura dos PHAs com PLA (50:50)
- Figura 43** Micrografia dos filmes de P3HB (a) aumento de 100 x, (b) aumento de 500 117 x e do filme de P3HFB (c) aumento de 100 x e (d) aumento de 500 x
- Figura 44** Perfilometria óptica imagens 2D e 3D dos filmes obtidos: (a) PLA, (b) 118 P3HB, (c) P3HP, (d) P3HBcoHP, (e) P3HBcoHV e (f) P3HFB
- Figura 45** Gráfico e tabela de dados de rugosidade obtidos por perfilometria óptica 2D 119 e 3D dos filmes
- Figura 46** Ângulo de contato dos filmes de PHA ($\theta = 0^\circ$ perfeitamente molhante; $\theta > 120$ 90° predominantemente não molhante; $\theta < 90^\circ$ predominantemente molhante e $\theta = 180^\circ$ não molhante)
- Figura 47** Painel de ensaios de intempéries: (a) Painel completo, (b) Amostras dos 121 filmes em tela de 2 mm, (c) e (d) Suportes preparados para análise em infravermelho, (e) e (f) Amostras padrão dos filmes de PLA e blenda com P3HB, (g) Filme de P3HFB puro e (h) Filme de P3HB puro
- Figura 48** Micrografia do filme de PLA exposto em painel de intempéries: (a) 45 dias; 122 (b) 90 dias; (c) 120 dias e (d) 180 dias
- Figura 49** Índice de carbonila (IC) calculado no início do experimento e após 180 dias 123 de exposição a intempéries
- Figura 50** Deconvolução do espectro de infravermelho das regiões de carbonila das 124 amostras de PLA+P3HBcoHV: (a) antes da exposição às intempéries e (b) após 180 dias de exposição às intempéries.
- Figura 51** Biodegradação em meio líquido em 120 dias: (a) Produção acumulada de 125 CO₂ e (b) Perda de massa (%) dos filmes
- Figura 52** (a) Porta amostra de tela em inox (1mm); (b) Estufa; (c) e (d) amostras em 126 triplicata; Amostras dos filmes após 45 dias: (e) PLA; (f) P3HB; (g) PLA+P3HP; (h) PLA+P3HBcoHP; (i) P3HBcoHV e (j) PLA+P3HFB
- Figura 53** Biodegradação dos filmes de PHA, PLA e Celulose (a) Perda de massa 127 (mg) em ensaio de biodegradação em solo com amostragem em: 45, 90, 120, 150 e 180 dias; (b) Percentual médio de massa biodegradada em 180 dias.
- Figura 54** Micrografia dos filmes de P3HB em biodegradação no solo: (a) 45 dias; (b) 128 90 dias; (c) 120 dias e (d) 180 dias.
- Figura 55** Micrografias obtidas por MEV após 180 dias da biodegradação em solo de 129 fragmentos dos filmes de PHA: (a) P3HBcoHV (1000x), (b) P3HBcoHV (3000x), (c) P3HFB (1000x) e (d) P3HFB (3000x)
- Figura 56** Micrografias obtidas por MEV do padrão de biodegradação dos filmes de 130 PHA: (a) P3HBcoHP (1000x), (b) P3HBcoHP (3000x), (c) P3HP (1000x) e (d) P3HP (3000x)

Figura 57 Biodegradação das blendas de PHA e PLA (50:50): (a) Perda de massa 130 (mg) em solo com amostragem em: 45, 90, 120, 150 e 180 dias; (b) Percentual médio de massa biodegradada em 180 dias.

Figura 58 (a) Bandejas do ensaio de germinação; (b) e (c) Início da germinação de 131 sementes de Mostarda; (d) Ervilha com 21 dias; (e) Trigo com 21 dias; (f), (g) e (h) medições das amostras em triplicata e (i) secagem final para avaliação de biomassa

Figura 59 Desenvolvimento dos espécimes de monocotiledônia cultivados indicando 133 medições da planta e raiz (cm) e de biomassa (mg): (a) Trigo (b) Rabanete

Figura 60 Desenvolvimento dos espécimes de dicotiledônia cultivados indicando 134 medições da planta e raiz (cm) e de biomassa (mg): (a) Ervilha torta (b) Mostarda crespa

Lista de Tabelas

Tabela 1	Análise elementar de CHN da biomassa agroindustrial (%); razões atômicas C:N, H:C, O:C e teor de umidade	65
Tabela 2	Perfis de decomposição térmica dos respectivos componentes da biomassa lignocelulósica (%) obtidos por análise termogravimétrica (TGA)	66
Tabela 3	Principais picos de absorvância dos espectros obtidos das análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) da biomassa lignocelulósica	68
Tabela 4	Dados obtidos por adsorção de nitrogênio (BET) e raios X a baixos ângulos baixos (SAXS) da biomassa agroindustrial	70
Tabela 5	Teores de lignina solúvel e insolúvel, frações de carbono orgânico e inorgânico e açúcares redutores totais dos meios hidrolisados	71
Tabela 6	Avaliação do crescimento de microrganismos nos meios sólidos obtidos dos hidrolisados ácidos e alcalinos	74
Tabela 7	Dados obtidos das curvas de crescimento dos microrganismos em meios hidrolisados ácidos com adição de meio concentrado e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ após 5 h.	78
Tabela 8	Avaliação do acúmulo de PHA por microscopia óptica após cultivo em meio líquido por 24 e 48 h e corados com corantes Sudan black e safranina	81
Tabela 9	Rendimentos de biomassa celular seca (CDW) e PHA (g.L^{-1}), relação ($\text{g}_{\text{PHA}}/\text{g}_{\text{substrato}}$), M_w (massa molar média), M_n (massa molar numérica média) e polidispersividade (M_w/M_n) obtidos em biorreator de 2 L	84
Tabela 10	Valores obtidos para diâmetro de partícula obtido por DLS e SAXS e potencial Zeta (PZ) dos PHAs	110
Tabela 11	Resultados médios dos ensaios mecânicos obtidos dos filmes dos biopolímeros puros e seus desvios padrão	115
Tabela 12	Resultados médios dos ensaios mecânicos obtidos das blendas de PHA e PLA (50:50) e seus desvios padrão	116

Resumo

Biopolímeros biodegradáveis do tipo PHA foram produzidos utilizando resíduos agroindustriais (casca de acácia, pele de amendoim, casca de arroz, casca de banana, bagaço de cana, fibra de coco, talo de fumo, farelo de trigo) e suas misturas em cultivos com *Bacillus sp.* Os melhores rendimentos foram obtidos dos resíduos de pele de amendoim, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo nos cultivos com microrganismos: *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens*. Foram obtidos: P(3HB), P(3HP), P(3HBcoHP), P(3HBcoHV) e ainda, P(3HFB) em meio misto de pele de amendoim, bagaço de cana e farelo de trigo cultivados com *Bacillus licheniformis*.

O cultivo com *Bacillus amyloliquefaciens* em batelada com reforço em lotes espaçados foi reproduzido em escala piloto de 35 L com os resíduos de pele de amendoim e farelo de trigo. Os rendimentos obtidos do meio misto de farelo de trigo e pele de amendoim foram: 9,3 g.L⁻¹ de biomassa celular e acúmulo de 66,7% de P(3HBcoHP). O cultivo com meio de farelo de trigo foi obtido: 7,8 g.L⁻¹ de biomassa celular com acúmulo de 57,2% de P(3HB).

Os PHAs em filmes demonstraram maior resistência mecânica do que PLA. Os valores de tensão de ruptura média foram: 5,5 ± 0,5% (P(3HB), P(3HP) e P(3HBcoHV), 12 ± 0,5% e 18 ± 1% para P(3HBcoHP) e P(3HFB), respectivamente, quando comparados ao PLA que sofre ruptura durante a deformação elástica em 2,0 ± 0,5%.

Os PHAs demonstraram ser toxicologicamente seguros para a linha celular MRC5 de mamíferos e em ensaios de germinação de sementes. Os resultados de biodegradabilidade atendem aos requisitos para aplicações biomédicas e para compor filmes para alimentos apresentando índices de biodegradação acima de 90% em 180 dias.

Abstract

Biodegradable biopolymers type polyhydroxyalkanoates (PHA) had been produced using agro-industrial residues (acacia bark, peanut skin, rice husk, banana peel, sugarcane bagasse, coconut fiber, tobacco stem, and wheat bran) and their mixtures in the cultivation *Bacillus* sp. The best yields were obtained from peanut skin residues, sugarcane bagasse and wheat bran in the cultivations with microorganisms: *Bacillus licheniformis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Were obtained: P(3HB), P(3HP), P(3HBcoHP), P(3HBcoHV) and P(3HFB) in mixed medium of peanut skin, cane bagasse and wheat bran in the cultivation with *Bacillus licheniformis*.

The cultivation with *Bacillus amyloliquefaciens* in batch with reinforcement in spaced lots was reproduced in a pilot scale of 35 L with the residues of peanut skin and wheat bran. The yields obtained from the mixed medium of wheat bran and peanut skin and were: 9.3 g.L⁻¹ of cell biomass and accumulation of 66.7% of P(3HBcoHP). Cultivation with wheat bran medium was obtained: 7.8 g.L⁻¹ of cell biomass with an accumulation of 57.2% P(3HB).

Film PHAs showed greater mechanical strength than PLA. The values of mean rupture stress were: 5.5 ± 0.5% (P(3HB), P(3HP) and P(3HBcoHV), 12 ± 0.5% and 18 ± 1% for P(3HBcoHP) and P(3HFB), respectively, when compared to the PLA that breaks during elastic deformation by 2.0 ± 0.5%.

PHAs have been shown to be toxicologically safe for the mammalian MRC5 cell line and in seed germination assays. The results of biodegradability meet the requirements for biomedical applications and for composing films for food with biodegradation rates above 90% in 180 days.

1 INTRODUÇÃO

Polihidroxicanoatos ou PHAs são poliésteres microbianos sintetizados e acumulados como grânulos intracelulares por alguns microrganismos pertencentes às bactérias que servem como reservas de carbono e energia para manutenção dos microrganismos produtores em condições de limitação de nitrogênio, fósforo ou oxigênio e excesso de carbono no meio. Os PHAs são produzidos através da biossíntese direta de carboidratos de cana-de-açúcar e de milho ou de óleos vegetais extraídos principalmente de soja e palma. Dependendo da composição monomérica podem ser utilizados na produção de embalagens, itens de descarte rápido, filmes flexíveis e aplicações biomédicas devido a sua alta biocompatibilidade e biodegradabilidade.

Os polihidroxicanoatos são considerados como uma alternativa aos polímeros sintéticos por ser um termoplástico natural, biodegradável e biocompatível produzido de fontes biológicas renováveis.

O P(3HB) (poli-3-hidroxi-butirato) foi o primeiro PHA a ser descoberto em 1926 e apresentava propriedades muito semelhantes aos plásticos convencionais como polietileno e polipropileno. Somente a partir de 1974 que o potencial das bactérias para produzir PHA com estruturas diferentes de P(3HB) foram descobertas. Adotando tecnologias avançadas de biotecnologia, incluindo engenharia genética, de uma maneira sistemática permitiu a produção fermentativa microbiana de poliésteres não naturais, como poli lactato (PLA), poli (lactato-co-glicolato) (PLGA), e até mesmo poliésteres que consistem em monômeros aromáticos de carboidratos derivados de biomassa renováveis, que podem ser amplamente usados nas indústrias químicas atuais.

Competindo no mercado com poliolefinas que são os polímeros mais importantes para os diversos mercados, e com “plásticos verdes” obtido de fontes renováveis, porém não biodegradáveis, os PHAs estão desfavorecidos devido aos maiores custos de produção. A contribuição do custo do substrato em si para a produção de PHAs é estimado entre 28 e 50% do custo total.

Atualmente, pesquisas concentram-se na busca de matérias-primas fermentáveis de baixo custo como substratos para produção de PHAs e a biomassa lignocelulósica de origem agroindustrial é uma delas. A biomassa vegetal é

composta, principalmente, de celulose e está disponível em grande escala e representa uma majoritária fonte renovável de matéria-prima para processos biotecnológicos bem como para produção de combustíveis orgânicos, suportes para fabricação de fármacos e materiais compósitos.

A biomassa vegetal de origem agrícola produzida anualmente no Brasil é uma excelente fonte de matéria-prima renovável para utilização em processos biotecnológicos. Estima-se que são gerados para cada tonelada produzida, os seguintes resíduos: milho (700 Kg de palha), arroz (220 Kg de casca), coco (850 Kg de casca), trigo (23% de farelo do peso em grão), cana (280 Kg de bagaço), casca de banana (25% em relação ao peso dos frutos) e casca de acácia (500 Kg de fibras). As diferentes combinações de fontes de carbono e microrganismos nos processos de fermentação podem gerar diferentes estruturas de PHA. A estrutura geral do PHA é mostrada na Figura 1.

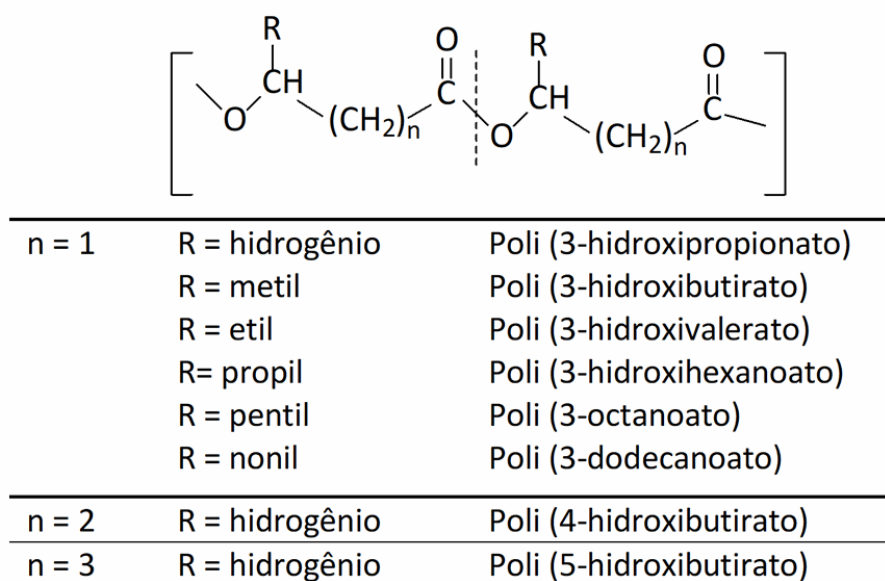


Figura 1 Estrutura geral de PHA, onde: n = número de repetições de unidades de (CH₂) e R = estruturas radicais mais comuns

Processos de hidrólise química ou enzimática e o desenvolvimento de bioprocessos devem ser melhorados, pois a natureza destes materiais pode gerar meios com baixa quantidade de açúcares, presença de inibidores microbianos e alto custo. Alternativas como a redução e reutilização de insumos visando um processo mais limpo devem ser revistos, assim como uma avaliação do ciclo de vida do produto em todas as etapas de produção.

A prospecção de uma produção mais limpa na agroindústria proporciona uma modelagem lógica e detalhada dos processos, possibilitando conhecer a principal fonte geradora de resíduos. A partir disso, o foco passa a ser buscar soluções capazes de minimizar o desperdício de materiais e até mesmo incorporá-los novamente ao processo produtivo. Aos processos, atuar através da conservação de matérias-primas, água e energia, eliminação de matérias-primas tóxicas e redução na fonte da quantidade e toxicidade das emissões e dos resíduos gerados. Já aos produtos, por meio da redução dos seus impactos negativos ao longo de seu ciclo de vida, desde a extração de matérias-primas até a sua disposição final.

Neste sentido, a presente tese buscou seguir os princípios desta metodologia nas áreas de operação, projeto, planejamento e gestão, buscando o desenvolvimento de novos produtos que traduzam em ganhos sociais e ambientais ao setor do agronegócio.

A tese está dividida em diferentes etapas. A primeira etapa baseou-se na prospecção entre oito biomassas de resíduos agroindustriais, que foram caracterizadas e avaliadas após diferentes processos de hidrólise para compor meios de cultivo microbiano para produção de PHA. A segunda etapa foi avaliar a produção de PHA realizando ensaios com quatro microrganismos do tipo *Bacillus sp.* em meio sólido e por fermentação em meio líquido, com um único bioprocessos aplicado para todos os meios.

Na etapa seguinte, os biopolímeros obtidos foram identificados e as melhores biomassas e microrganismos produtores foram selecionados e combinados para escalonamento, da bancada até escala piloto em biorreator de 35 L. Cinco diferentes estruturas de PHA foram caracterizadas e após combinadas em blendas com PLA e avaliadas quanto sua toxicidade e potencial de biodegradação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Produtos à base de plástico com propriedades como leveza, alta durabilidade e facilidade de processamento podem ser produzidos a preços muito baixos. Assim, os plásticos são amplamente utilizados em praticamente todos os aspectos de nossas vidas diárias. Nos últimos 50 anos, houve um aumento contínuo na demanda por plásticos e, em 2020, a produção global de plásticos foi estimada em aproximadamente 550 milhões de toneladas até 2030. No entanto, a característica durável dos plásticos atribuídos à sua não biodegradabilidade também tornam difícil o tratamento desses materiais por meio de sistemas de purificação natural, como degradação biológica, quando estes são descartados como lixo, o que resulta no acúmulo de resíduos plásticos na terra e nos oceanos, comumente referidas como ilhas de plástico. Além disso, microplásticos derivados de produtos cosméticos, como pastas de dente e produtos de limpeza, ou formado pela fragmentação de grandes resíduos de plástico por meio do processo de intemperismo em ecossistemas marinhos, exacerbaram o problema do plástico na medida em que agora é uma das crises globais mais graves que ameaçam o ecossistema e saúde humana ^{1,2}.

Além disso, a maioria dos plásticos produzidos com processos químicos à base de petróleo pode contribuir para outros problemas ambientais, incluindo as mudanças climáticas. Para resolver essas questões relacionadas ao plástico, esforços substanciais têm sido feitos em todo o mundo. A este respeito, embora a reciclagem seja uma das abordagens mais utilizadas, apenas seis tipos de plásticos, a saber: tereftalato de polietileno (PET), polietileno de alta densidade (PEAD), cloreto de polivinila (PVC), polietileno de baixa densidade (PEBD), polipropileno (PP), e poliestireno (PS) são passíveis de serem parcialmente reciclados e, em 2019, o percentual de reciclagem desses plásticos representou apenas 18%. Em um esforço para resolver o problema de não-biodegradabilidade, plásticos biodegradáveis, como: poliglicolato (PGA), poli- ϵ -caprolactona (PCL), álcool polivinílico (PVOH), polilactato (PLA) e polihidroxialcanoatos (PHAs) foram desenvolvidos para substituir os plásticos à base de petróleo. As refinarias tradicionais à base de petróleo se mantêm dependentes de combustíveis fósseis para atender aos requisitos globais de energia, produtos químicos e materiais. No

entanto, preocupações com relação ao meio ambiente como a poluição, emissões de gases de efeito estufa, mudanças climáticas e indústrias não sustentáveis baseadas no petróleo têm levado ao desenvolvimento de biorrefinarias para indústrias sustentáveis desenvolvendo processos de produção de base biológica utilizando biomassa renovável e ambientalmente sustentáveis ³⁻⁷.

Dadas às crescentes preocupações associadas à produção, uso e descarte de plásticos, vários estudos têm se concentrado em desenvolver cepas microbianas para a produção de plásticos de base biológica e biodegradáveis ⁸.

PHAs são poliésteres naturais biodegradáveis produzidos por numerosos microrganismos. Dado que esses polímeros possuem propriedades físicas e termoquímicas de materiais comparáveis às dos plásticos baseados em petróleo eles têm sido ativamente estudados como materiais promissores para resolver questões relacionadas aos plásticos usados atualmente. O material e as propriedades dos PHAs podem variar dependendo do comprimento da cadeia e da composição do monômero. Avanços recentes no desenvolvimento de cepas microbianas com base na engenharia metabólica tradicional combinada com as tecnologias de biologia sintética denominada "engenharia metabólica de sistemas", aumentou a eficiência das biorrefinarias em termos de tempo e custos de produção ^{3,8,9}.

O PHB (polihidroxibutirato) foi o primeiro PHA a ser descoberto (1926) e pode ser acumulado em bactérias em até 80% do peso de células secas e apresentava propriedades muito semelhantes aos plásticos convencionais como polietileno e polipropileno ¹⁰. Somente a partir de 1974 que o potencial das bactérias para produzir PHA com estruturas diferentes de P(3HB) foram descobertas. Uma variedade de homopolímeros e copolímeros com moléculas de pesos entre 50.000 e 1.000.000 Da e mais de 160 monômeros diferentes já foram relatados e produzidos usando diferentes meios de cultivo e microrganismos ⁸.

A síntese de PHAs normalmente ocorre quando há excesso de fonte de carbono e energia disponível e limitação de pelo menos um nutriente necessário à multiplicação das células bacterianas (N, P, Mg, Fe, etc). De modo contrário, quando há limitação de carbono ou energia, mas não de outros nutrientes, PHAs podem ser reutilizados para suprir esta necessidade ¹¹.

Existem três tipos principais de PHAs, dependendo do número de átomos de carbono na cadeia. Os PHAs de cadeia curta (scl-PHA) são compostos de três a cinco átomos de carbono (C3 a C5), como: poli-3-hidroxi-butirato (P3HB), e poli-3-hidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato (P3HBcoHV). Os PHAs de cadeia média (mcl-PHA) apresentam entre seis e quatorze átomos de carbono (C6 a C14), neste grupo os principais são: poli-3-hidroxi-hexanoato (PHHx) e o poli-3-hidroxi-octanoato (PHO). PHAs de cadeia longa (lcl-PHA) são compostos por mais de quatorze átomos de carbono (>C14). A diversidade estrutural de homopolímeros ou copolímeros de PHA é dependente do suprimento da fonte de carbono (monômero de substrato), a especificidade da enzima PHA sintase e das vias metabólicas a que os microrganismos sejam submetidos. Assim, o homopolímero de PHA contém apenas um tipo de HA como unidade monomérica enquanto o copolímero PHA é composto de mais um tipo de unidade monomérica ^{12,13}.

A grande diversidade de PHAs sintetizados por bactérias ainda incluem estruturas como: hidroxialcenoatos contendo uma ou duas insaturações, hidroxialcanoatos com grupos metila ou hidroxila em diferentes posições, contendo carboxi livres, carboxi esterificados a alquilas ou ainda ácido benzóico, fenoxi ou acetoxi, para-cianofenoxi ou para-nitroxila, hidroxilas secundárias, epóxi, ciano ou átomos como: flúor, cloro ou bromo ligados ao carbono terminal do monômero. Algumas dessas estruturas de PHA foram compiladas e são mostradas no Anexo ^{11,14}.

Armazenados no citoplasma da célula, de forma esférica e refrativa à luz, os grânulos de PHA consistem em um núcleo hidrofóbico de cadeias de PHA agrupados e esse núcleo é recoberto por enzimas mais hidrofílicas e proteínas estruturais, que, ainda não foram esclarecidas definitivamente podendo formar uma membrana proteica ao redor do grânulo. É proposto que os grânulos de PHA são mais do que simples inclusões de polímero, mas sim organelas funcionais como corpos de inclusão com várias funções biológicas ^{15,16}. Nos últimos anos, outros papéis biológicos do PHA foram elucidados. Além de seu papel para a esporulação em *Bacillus*, sua interação com o metabolismo de fixação de nitrogênio e outros, eles exercem uma função protetora para as células quando expostas a condições ambientais perigosas, como solventes tóxicos, estresse oxidativo, calor ou congelamento, hipersalinidade ou radiação UV ¹⁶.

Em trabalho mais recente, Bresan e colaboradores (2016) descreveram a estrutura dos grânulos de PHB sem a presença de fosfolipídios. De acordo com este estudo, os grânulos de polihidroxibutirato (PHB), também designados como carbonossomos, são complexos supramoleculares que consistem em um núcleo de polímero PHB e uma camada superficial de estruturas de proteínas funcionais. A suspeita da presença de fosfolipídios na camada superficial era baseada até então, em dados obtidos *in vitro* de grânulos de PHB isolados, no entanto, a presença *in vivo* nas células de uma camada de fosfolipídios nunca havia sido demonstrada. Os ensaios utilizando marcadores fluorescentes de proteína concluíram que os carbonossomos de representantes de α -proteobactérias, β -proteobactérias e γ -proteobactérias não têm fosfolipídios *in vivo* e que as camadas de superfície dos grânulos de PHB / PHA em produtores naturais geralmente são livres de fosfolipídios e consistem apenas em proteínas ¹⁷. A Figura 2 mostra grânulos de PHB acumulados em célula bacteriana e estrutura do grânulo de PHA.

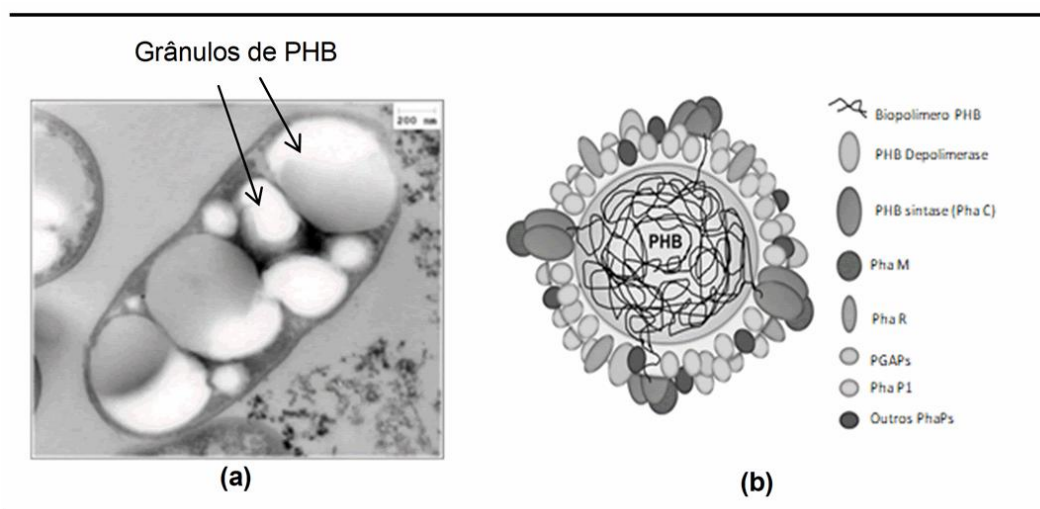


Figura 2 (a) Imagem de micrografia eletrônica de transmissão de grânulos de P3HB acumulados em *Burkholderia* sp. após 48 h de cultivo ¹⁸, (b) Estrutura do grânulo de PHB modificado de Bresan (2016) ¹⁷

A Figura 2 (a) mostra a distribuição dos grânulos de PHB acumulados em *Burkholderia* sp., o diâmetro dos grânulos de PHA pode variar entre 0,2 e 0,5 μm . Este tamanho é apenas um pouco menor do que o diâmetro celular médio da maioria das espécies de bactérias (0,4 a 1 μm) ¹⁵. A Figura 2 (b) descreve a estrutura

sugerida por Bresan e colaboradores mostrando o polímero de PHB envolto por várias proteínas com funções diferentes para a síntese do PHA¹⁷.

A extração de PHAs intracelulares da biomassa celular pode ser uma etapa desafiadora no desenvolvimento de um bioprocessamento comercialmente viável. A separação dos grânulos de PHA da biomassa microbiana e remoção da camada proteica podem ser facilmente realizadas utilizando-se solventes halogenados, os quais são caros e de difícil manuseio em função da sua toxicidade. Um protocolo ideal de extração deve resultar em altos níveis de recuperação e pureza do PHA e ser de baixo custo. Gahlawat e colaboradores¹⁹ revisaram diferentes protocolos de recuperação que foram usados por vários pesquisadores para a extração de grânulos de PHAs das células, listando suas vantagens e desvantagens. Estas informações são mostradas em tabela compilada no Anexo III.

De modo geral, os processos de extração envolvem o rompimento das células e subsequente separação do polímero dos fragmentos celulares e outros resíduos. A ruptura celular pode ser obtida através de um pré-tratamento empregando produtos químicos (por exemplo: tratamentos com álcali, ácidos) e/ou métodos físicos (por exemplo: calor e sonicação). O uso de solventes orgânicos no processo de extração é bastante comum e geralmente envolve uma modificação da permeabilidade da membrana celular seguida da dissolução do polímero. A separação do polímero pode ser realizada por evaporação do solvente ou por precipitação em um não solvente. Os solventes mais comumente utilizados são hidrocarbonetos clorados como: clorofórmio, cloreto de metileno e 1-2 dicloroetano. Como as soluções de polímero são muito viscosas, torna-se necessário o uso de grandes volumes de solvente para remover todos os resíduos celulares o que torna o processo mais caro²⁰.

Diferentes pesquisas têm explorado vários solventes não halogenados tais como: carbonato de polipropileno, etanol, acetato de butila, acetato de etila, etc. como uma alternativa ecológica aos solventes halogenados para extração de PHA. Gahlawat e Soni (2017)²¹ relataram que o carbonato de polipropileno pode ser usado como um solvente para recuperação de PHAs e obtiveram um rendimento de 90% e pureza de 93% com tratamentos a 120 °C por 30 min. Como o carbonato de polipropileno apresenta um ponto de ebulição de 240 °C isso previne a sua

evaporação para o ambiente e ainda pode ser reutilizado para vários ciclos de purificação ²².

Em um relatório recente, um sistema de solventes ecológico de acetona / etanol / carbonato de polipropileno na proporção de 1:1:1 (v/v/v) foi desenvolvido para recuperação de PHAs de células de *C. necator*. O sistema solvente: A/E/CP resultou em recuperação máxima de PHAs de 85% e pureza de 92% da biomassa seca pré-tratada. A eficiência deste sistema de solvente biorrenovável foi testada posteriormente em maior escala em um reator de alta pressão, o maior rendimento de recuperação de PHA de 65% foi obtido a 145 °C. Além disso, os rendimentos de pureza e recuperação foram melhorados com o uso do hexano como precipitante ²³.

Por várias décadas, uma ampla gama de organismos, incluindo bactérias e eucariotos foi desenvolvida para produzir PHAs com eficiência para possíveis aplicações industriais ²⁴.

A engenharia metabólica tem sido aplicada com sucesso para apoiar o desenvolvimento de vários microrganismos, incluindo *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* e *Cupriavidus necator* (anteriormente conhecido como *Alcaligenes eutrophus*) seguido por *Ralstonia eutropha*, que são utilizados como células microbianas de referência para produção de PHA ^{9,25,26}.

Com base nesses esforços, várias empresas estabeleceram esse foco na produção de PHA. Junto com os avanços tecnológicos na produção de PHA, as empresas expandiram seu alcance de tipos de produtos e capacidades em resposta às crescentes preocupações em relação aos plásticos sintéticos. Alguns dos principais microrganismos utilizados para produzir PHAs a partir de diferentes resíduos da indústria de alimentos são: *Alcaligenes latus* (P(3HBco3HP)) a partir de malte, resíduos de leite, vinagre e óleo de soja e gergelim; *Burkholderia cepacia* (PHB, PHBV) de óleo de palma bruto, ácido oleico, xilose, ácido levulínico e melão de beterraba; *Escherichia coli* modificada (PHB) a partir de glicose, glicerol, óleo de palma e etanol; *Pseudomonas aeruginosa* (mcl-PHAs) de glicose, ácido oleico, resíduos de ácidos graxos livres; *Rhizobium meliloti* (PHB) em meios ricos de glicose, sacarose, galactose, xilose e maltose; *Cupriavidus necator* (PHB e copolímeros) em presença de glicose, sacarose, frutose, valerato, octanoato, ácido láctico e óleo de soja e, *Spirulina platensis* (PHB) a partir de dióxido de carbono ²⁷.

Em recente revisão de Koller e colaboradores ²⁸, na maioria dos casos, os microrganismos produtores de scl-PHA convertem fontes de carbono simples como açúcares, álcoois ou lipídios via acetil-CoA em 3HB; a produção de 3HV ou 4HB normalmente requer substratos precursores estruturalmente relacionados, como os precursores de 3HV: o ácido propiônico, ácido valérico, ácido levulínico e coquetéis de ácidos graxos fracionados. Entre *Archaea* extremofílicas, capazes de sobreviver em condições extremas, uma série de cepas como *Haloferax mediterranei* ou *Halogeometricum borinquense* foram identificadas, que produzem copoliésteres de 3HB e 3HV (PHBcoHV) a partir de substratos simples e estruturalmente não relacionados, como carboidratos ou glicerol, que por sua vez reduz os custos para síntese do copoliéster. Entre eubactérias, a produção de copoliéster PHA a partir de substratos não relacionados é uma característica escassa e relatada, por exemplo, para a cepa Gram-positiva *Bacillus licheniformis* PL26 ²⁹ e a cepa Gram-negativa *Hydrogenophaga pseudoflava* ³⁰.

Na maioria dos casos, mcl-PHA são heteropoliésteres de diferentes hidroxialcanoatos distribuídos aleatoriamente e são tipicamente sintetizados por bactérias Gram-negativas do gênero *Pseudomonas* e, ao contrário do scl-PHA, apresentam baixa cristalinidade e baixa temperatura de transição vítrea; macroscopicamente, eles aparecem como “biolátex” altamente elásticos ³¹. A geração de homopoliésteres de mcl-PHA, como poli-3-hidroxihexanoato (PHHx) ou poli-3-hidroxi octanoato (PHO), é descrita principalmente por cepas de produção geneticamente modificadas ³².

Os quadripolímeros formam uma nova classe de PHA constituído de pelo menos quatro diferentes tipos de monômeros PHA, um exemplo descrito recentemente polímero produzido por *Cupriavidus eutrophus* cepa B10646. Este PHA consiste nos blocos de construção quirais 3HB, 3HV (scl-PHA) e 3-hidroxi hexanoato (3HHx) (mcl-PHA) e o bloco de construção aquiral scl-PHA (4HB) ³³. Outros pesquisadores também produziram quadripolímeros do tipo poli (glicolato-co-lactato-co-3HB-co-4HB) por engenharia metabólica de *Escherichia coli* ³⁴.

No contexto do ácido láctico como constituinte do PHA, Taguchi e colaboradores descreveram pela primeira vez a ocorrência deste 2-hidroxialcanoato em PHA produzido microbianamente a partir de uma cepa de *Pseudomonas* sp.

modificada ^{35,36}. As estruturas de scl-PHA e mcl-PHA mais exploradas são mostradas na Figura 3.

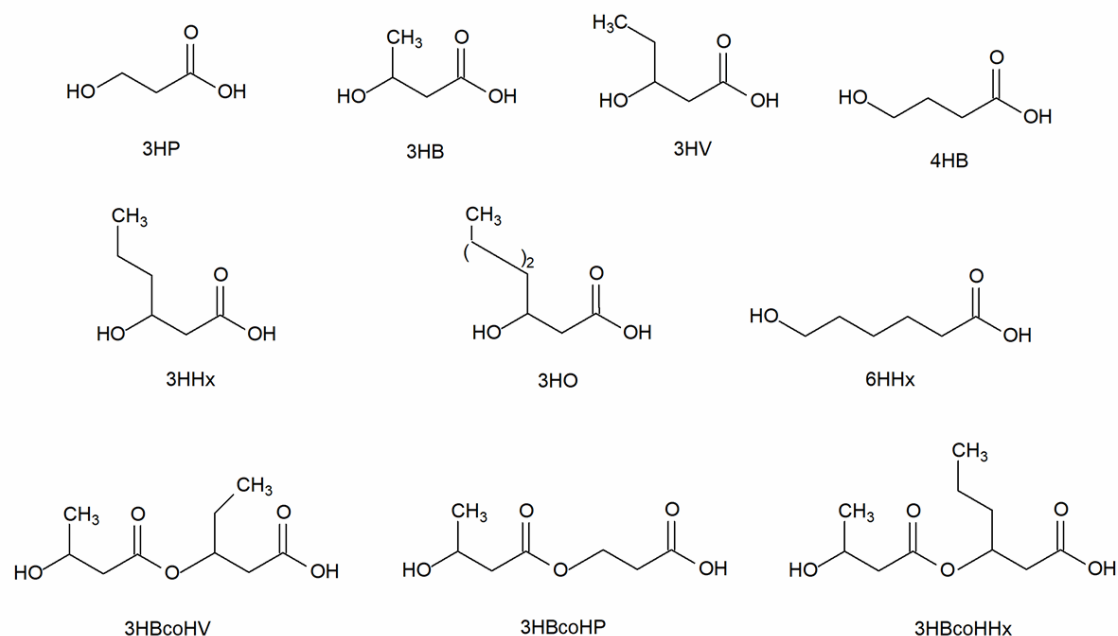


Figura 3 Exemplos de alguns monômeros detectados em PHAs sintetizados por bactérias. Compilado a partir de Steinbüchel e Valentin ³⁷

A PHA sintase (PhaC) é a principal enzima envolvida na biossíntese de PHA e a responsável pela polimerização de substratos em hidroxialcanoato monoméricos. Atualmente, foram relatados 14 tipos de PHA sintase que levam à síntese de PHA e foram categorizadas em quatro classes principais com base em suas sequências primárias, especificidade do substrato e composição da subunidade. A classe I compreende enzimas que consistem em um único tipo de PhaC, que forma um homodímero, enquanto a Classe II contém dois tipos de sintase, PhaC1 e PhaC2. As sintases de classe III e IV formam heterodímeros, compreendendo PhaC-PhaE e PhaC-PhaR, respectivamente. As sintases de classe I, III e IV tendem a favorecer monômeros de cadeia de comprimento curto (scl) de 3 a 5 carbonos, como poli-3-hidroxi-butirato P(3HB) e PhaC para o poli-hidroxi-butirato de alto peso molecular P(4HB). As sintases de classe II favorecem monômeros de cadeia de comprimento médio (mcl) de 6 a 14 carbonos, tais como poli-3-hidroxi-hexanoato (P3HHx). As sintases de classe IV são enzimas de dois componentes, que consistem de uma

subunidade catalítica PhaC e uma segunda subunidade PhaR capazes de polimerizar monômeros de cadeia curta e média³⁸⁻⁴⁰.

Bacillus sp. que possui a PHA sintase de classe IV, tem a capacidade de produzir P(3HA-scl; 3HA-mcl) o que o coloca em uma categoria diferenciada para exploração na produção de PHAs. A versatilidade para metabolizar diferentes fontes de carbono torna este microrganismo um potencial produtor de PHAs sob diferentes condições de cultivo. Dependendo do substrato podem ser obtidos: PHB, P(3HB; 3HV), P(3HB; 3HHx), P(3HB; 4HB; 3HHx) e P(3HB;6HHx;3HHx)^{41,42}. Um número de espécies de *Bacillus*, mas não todas, podem acumular PHA em suas células sob condições de crescimento estressante ou desequilibrado. As espécies de *Bacillus* relatados como produtores nativos de PHA são os seguintes: *B. amyloliquefaciens*, *B. anthracis*, *B. aryabhatai*, *B. badius*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. flexus*, *B. laterosporus*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. odisseia*, *B. pasteurii*, *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, e algumas espécies ou isolados não identificados⁴³. O maior acúmulo de PHA relatado até agora é de 88,7% em peso de células secas usando *B. licheniformis* M2-12⁴⁴.

Microrganismos do gênero *Bacillus* sp. já foram cultivados em meios alternativos de baixo custo como bagaço de cana, farelo de trigo e lodo ativado acumulando cerca de 6 g.L⁻¹ de PHB para *Bacillus licheniformis* e 5,5 g.L⁻¹ para *Bacillus circulans*⁴⁵. P(3HB) foi produzido a partir de resíduos de abacaxi por *Bacillus* sp. alcançando a concentração de 1,86 g.L⁻¹ e produtividade de 0,077 g.L⁻¹.h⁻¹ em meios de cultivo sem controle de pH e aeração⁴⁶. *Bacillus* sp. produziu o copolímero P(3HB-co-3HV) quando foi utilizado como único substrato de carbono: glicose ou glicerol e produziu poli-hidroxitubirato (PHB) quando o acetato de sódio foi usado como único substrato de carbono⁴⁷. *Bacillus cereus* (FA11) isolado de solo contaminado por trinitrotolueno (TNT) foi capaz de acumular 48,4% de P(3HB-co-3HV) utilizando glicose como única fonte de carbono após 48h de incubação a 30 °C¹². Ao lado do melaço, a flor de Mahua pode ser considerada como uma fonte de carbono mais barata para a síntese de copolímeros de PHA e foi utilizada para a biossíntese de PHB-co-HV, na proporção de 90:10, por *Bacillus* sp. que acumulou 51% de sua biomassa em PHA, desempenho superior em comparação com *Rhizobium meliloti* (31%) e *Sphingomonas* sp. (92%)⁴⁸. As espécies bacterianas

Bacillus circulans MTCC 8167, isolado de solo contaminado com óleo cru, produziu eficientemente P (3HB-co-3HV) de cadeia média a partir de fontes de carbono de baixo custo como a dextrose ⁴⁹.

A massa molecular média (Mn) em uma cadeia de PHAs produzido por *Bacillus* é aproximadamente $30 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$ ^{50,51}. No entanto, vários estudos relataram produção de PHA com Mn mais baixa ($1,8 - 8,5 \times 10^4 \text{ g.mol}^{-1}$) com cepas de *Bacillus*, especialmente quando cultivado por um longo tempo. Os microrganismos são capazes de metabolizar o PHA por ação de depolimerases que seriam as principais responsáveis por essa diminuição do peso molecular. A regulação metabólica da esporulação e a mobilização de PHA em *Bacillus* são de grande interesse, uma vez que o PHA de baixo peso molecular pode ser rapidamente metabolizado pelo desenvolvimento de endósporos ⁵².

A cinética da biossíntese de PHA pode estar ou não associada ao crescimento e aumento da biomassa microbiana. Para a maioria das cepas de produção, a biossíntese de PHA é potencializada em condições que limitam a propagação da massa celular microbiana. A produção de PHA não associada ao crescimento consiste de duas fases facilmente distinguíveis, sob condições ricas de nutrientes, a concentração de biomassa microbiana aumenta até o esgotamento de um nutriente essencial para o crescimento, como uma fonte de nitrogênio ou fosfato. Iniciada a segunda fase de cultivo a biomassa microbiana permanece praticamente estável e ocorre um aumento linear de PHA intracelular ocorrendo acúmulo até que se esgote a fonte externa de carbono ou por impedimentos estéricos determinados pela geometria da célula. Alguns produtores de PHA podem produzir grandes quantidades de biopolímero em condições nutricionais equilibradas chamadas de produção de PHA associada ao crescimento. Nos dois casos pode ocorrer produção de PHA mesmo sem a limitação de nutrientes ⁵³.

Uma situação extrema é descrita para os chamados “hiperacumuladores de PHA”, como *Pseudomonas* 2F, que mostram taxas de acumulação de PHA extraordinariamente altas após um período de fome e subsequente realimentação de fontes de carbono exógenas ⁵⁴. Isso deixa claro que um processo de produção de PHA otimizado precisa estar de acordo com a cinética do processo, o regime de alimentação para os diferentes componentes de nutrientes e a engenharia do

processo. Independentemente do grau de associação de crescimento da biossíntese de PHA, o alcance de alta densidade celular (alta concentração de biomassa ativa) é indispensável para a obtenção de alta produtividade volumétrica de PHA como fator econômico crucial. Portanto, tanto a formação de biomassa quanto a fase de acumulação de PHA devem ser otimizadas para aumentar a produtividade geral ⁵⁴.

Diferentes processos fermentativos são descritos para produção de PHAs podendo ser em batelada com uma ou duas etapas, cultivo em biorreatores seriados ou cultivos contínuos com realimentação direta do biorreator ^{55,56}.

Tecnologicamente, os PHA são produzidos sob condições controladas de valor de pH, concentração de oxigênio dissolvido e temperatura em biorreatores (“fermentadores”) de diferentes tamanhos e tipos. O tipo mais comum é o reator de tanque (STR), um aparelho bem conhecido para produção de fermento, vinagre ou etanol. Para a produção de PHA, esses STRs podem ser operados descontinuamente (lote, lote repetido, lote alimentado, lote alimentado repetido) ou continuamente (CSTR). Todo o processo de produção de PHA é multifacetado e precisa de otimização de cada etapa do processo com a engenharia de processo sendo um dos fatores mais decisivos, especialmente em processos em grande escala. Particularmente quando fluxos de resíduos baratos são aplicados como substratos para a produção de PHA, o aumento da escala para escalas industrialmente relevantes enfrenta vários desafios ⁵⁷. Como consequência, a fim de reduzir o número de experimentos de cultivo durante o desenvolvimento e aumento da escala do processo e identificar gargalos metabólicos do bioprocessamento em desenvolvimento, a análise cinética e a modelagem matemática do processo ganham cada vez mais atenção na pesquisa e desenvolvimento relacionada ao PHA ^{34,58}.

Os processos de produção descontínuos de PHA ou cultivos em lote, descritos em diferentes trabalhos são simples em sua operação, mas intrinsecamente de baixa produtividade. A concentração máxima permitida de fonte de nitrogênio e carbono no início do lote de fermentação é restringida por pré-condições fisiológicas da cepa de produção e normalmente, a concentração de fontes de nitrogênio no início dos processos de produção de PHA chega a cerca de 2 a 3 g.L⁻¹ de sulfato de amônia para as cepas de produção mais importantes e as concentrações de fonte de carbono a cerca de 10 a 30 g.L⁻¹ para substratos simples

como glicose, sacarose, ou glicerol. No caso do mcl-PHA, para substratos relacionados como ácidos graxos, as concentrações de inibição muitas vezes estão abaixo de 1 g.L^{-1} , o que entra em conflito drástico com as estratégias de produção em lote e o mesmo é válido para compostos precursores de 3HV no caso da produção de scl-PHA. Além disso, a fonte de carbono submetida no início tem que ser superior ao substrato limitador de crescimento disponível e sofre, de forma análoga a outros processos de produção de PHA, conversão em biomassa, PHA, CO_2 e metabólitos menores, resultando assim em uma baixa conversão geral e rendimento da fonte de carbono para PHA. Considerando um rendimento de conversão teórico abaixo de $0,48 \text{ g / g}$ para biomassa e PHA, respectivamente, pode-se facilmente imaginar que tais processos estão longe de serem economicamente viáveis ^{28,59}.

Apenas recentemente, Gahlawat e colaboradores demonstraram uma abordagem simples de “lote repetido” para aumentar a produtividade da biossíntese de PHB por *Azohydromonas australica* DSM 1124, uma cepa anteriormente conhecida como *Alcaligenes latus*. O cultivo em batelada foi iniciado em um biorreator de tanque agitado de 7 L até que dois terços da sacarose da fonte de carbono e todas as fontes de nitrogênio (sulfato de amônia) fossem esgotados; neste ponto, as células estavam em uma fase de crescimento estacionário. Durante essa fase do lote, que durou 36 h, foram produzidos $8,71 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa celular seca e $6,24 \text{ g.L}^{-1}$ de PHB, o que corresponde a uma produtividade volumétrica de $0,17 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. A próxima etapa foi drenar cerca de 20% do caldo de fermentação e substituir o mesmo volume por meio de cultivo fresco, que era composto da mesma forma que o meio inicial e continha também fontes de nitrogênio, pois a biossíntese de PHA por este organismo ocorre de forma associada ao crescimento. Cada vez que a concentração de sacarose caía para menos de 8 g.L^{-1} , era feita uma reposição de 20% do caldo de fermentação ¹⁹.

Atualmente, um esforço crescente tem sido observado para otimizar a aplicação de consórcios microbianos mistos (CMM) para biossíntese de PHA como uma alternativa barata para processos baseados em culturas puras. Consórcios microbianos naturais, geralmente presentes em lodos ativados, naturalmente acumulam PHA sob condições ambientais dinâmicas e o aumento da biossíntese de PHA pode ser alcançado por meio dos chamados “regimes de alimentação de fome

e fartura cíclica", que consistem em uma série de disponibilidade alternada (fartura) e ausência de nutrientes (fome). Na maioria dos casos, esses sistemas também são operados no modo de cultivo em lote repetido. Usando CMM, o PHA pode ser produzido com produtividade máxima e baixos custos devido a pequenas demandas de esterilidade, requisitos reduzidos para os equipamentos e dispositivos de controle e, acima de tudo, o CMM pode utilizar matérias-primas complexas e baratas, como efluentes domésticos ou industriais, efluentes de óleos, glicerol bruto, ácidos graxos voláteis. Os rendimentos e produtividade obtidos destes meios têm sido excelentes, mas os biopolíésteres são misturas de copolímeros e/ou homopolímeros o que dificulta regular a microestrutura e qualidade do polímero^{60,61}.

Os principais PHAs comercialmente disponíveis e suas aplicações são: **Biopol** da Metabolix (Cambridge, MA, USA) um copolímero de poli (3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-valerato). Trata-se de um copolímero termoplástico de ponto de fusão na faixa de 140-180 °C e que possui uma variedade de usos como, embalagem, garrafas de xampu, aparelhos de barbear descartáveis, copos descartáveis, pontos e alfinetes cirúrgicos, facas descartáveis e garfos e forros de fraldas; **Nodax** da Procter & Gamble é uma adição recente à família de copolímeros de PHA consistindo de 3-hidroxi-butarato e uma quantidade comparativamente pequena de monômeros de cadeia média com grupos laterais maiores ou igual a três unidades de carbono. As unidades de mcl utilizadas incluem 3-hidroxi-hexanoato, 3-hidroxi-octanoato e 3-hidroxi-decanoato e está disponível como espumas, fibras ou não tecidos, filmes e látex entre outros; **Biogreen** da Mitsubishi Gas Chemicals, com sede no Japão, desenvolveu a produção de P(3HB) a partir de metanol. Além do potencial como material plástico, os PHAs também são úteis no campo da medicina, especialmente P3HB, P3HB-3HV, P4HB, P3HO e P3HB-3HHx que são frequentemente utilizados na engenharia de tecidos. Eles são amplamente utilizados como placas ósseas e materiais osteossintéticos para tratamento dentário e maxilofacial, suturas cirúrgicas e implantes (na liberação lenta de drogas e hormônios). A maior contribuição das PHAs para medicamentos foi na área cardiovascular para regeneração de tecidos arteriais, enxertos vasculares, *stents* cardiovasculares e válvulas cardíacas⁶².

O mercado global de bioplásticos deve crescer mais de 15% nos próximos cinco anos, segundo Hasso von Pogrell, diretor administrativo da European Bioplastics. Com um mercado estimado em US \$ 57 milhões em 2019, o tamanho do

mercado global de polihidroxialcanoato (PHA) está projetado para chegar a US \$ 98 milhões até 2024, crescendo cerca de 11,2%. A crescente demanda por plásticos biodegradáveis fortalecida por regulamentações e políticas governamentais rigorosas contra plásticos de uso único e as tendências relacionadas ao desenvolvimento sustentável e economia circular estão impulsionando a indústria de PHA. A Europa é o principal mercado de PHA, globalmente, seguida pela América do Norte e APAC (região Ásia-Pacífico). Espera-se que a Europa responda pela maior parcela do mercado de PHA durante o período de previsão.

Com vistas ao desenvolvimento da capacidade regional, a Ásia continua sendo um importante centro de produção, com mais de 45% dos biopolímeros sendo produzidos lá. Atualmente, um quinto da capacidade de produção está localizado na Europa. Prevê-se que essa participação cresça até 30% até 2024. Kaneka Corporation (Japão) é um dos principais fabricantes de PHA. A empresa anunciou planos de expandir sua capacidade de produção para 5.000 toneladas por ano a partir de dezembro de 2019 e 10.000 toneladas por ano no futuro próximo. A expansão fortalecerá a posição da empresa no mercado global de polihidroxialcanoato.⁶³

A pesquisa atual sobre PHAs se concentra em temáticas tais como obter uma melhor compreensão dos mecanismos relacionados à sua biossíntese, ou como modular as propriedades dos PHAs para diferentes aplicações. O desenvolvimento de microrganismos naturais e recombinantes para produzir PHAs de forma eficiente e a busca de matérias-primas alternativas que levem sua produção a custos mais competitivos também são tópicos de pesquisa importantes. Os PHAs apresentam grandes vantagens em comparação com os polímeros sintéticos tradicionais. No entanto, é por causa de sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade que torna estes materiais especialmente atraentes para aplicações biomédicas e houve um aumento da exploração de PHAs nas últimas décadas na biomedicina. Além disso, um benefício adicional é que o pH do meio não se altera durante a degradação. Isso os torna bem tolerados pelas células e pelo sistema imunológico em comparação a outros polímeros usados clinicamente, como: poli (lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA), poli (ϵ -caprolactona) (PCL), poli (ácido glicólico) (PGA) e poli (ácido láctico) (PLA)⁶⁴.

Em suma, os PHAs possuem um alto custo de produção por dependerem, em sua maioria, de culturas microbianas puras e bem específicas para determinados meios de cultivo. Muitos estudos se mantêm em nível de bancada e com o aumento do interesse do mercado internacional torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologia com menor custo que seja viável industrialmente. Assim, a utilização de resíduos agroindustriais como fonte de carbono, de microrganismos de fácil manuseio e de processos de purificação simplificados, poderia contribuir significativamente para a redução dos custos para obtenção de diferentes PHAs.

Um novo paradigma denominado consumo e produções sustentáveis foram aceitos como o objetivo final a ser alcançado na sociedade de hoje. A regulamentação ambiental de fim de linha (end-of-pipe) convencional concentra-se apenas nas emissões dos processos de fabricação de um produto. A incorporação de aspectos ambientais positivos em processos de desenvolvimento de novos produtos incluem atividades, processos e materiais problemáticos associados ao produto, incluindo uso de matérias-primas, fabricação, distribuição, uso e fim de ciclo de vida ⁶⁵.

Com base nesses dados, surgiram-nos alguns questionamentos:

- É possível realizar um processo de hidrólise de baixo custo que possa ser aplicado em diferentes resíduos agroindustriais capazes de compor um meio fermentável rico em carbono para produção de PHA?
- Microrganismos como *Bacillus sp.* seriam capazes de produzir PHA com alto rendimento nestes meios?
- Quais as características físicas e estruturais do PHA produzido pelos diferentes substratos e suas misturas?
- Quais as possíveis aplicações dos PHAs obtidos?
- Qual a dinâmica do bioprocesso desenvolvido no ciclo de vida do PHA obtido?

A hipótese da presente tese é que a produção de biopolímeros biodegradáveis do tipo PHA pode ser realizada a partir de resíduos agroindustriais, em processo de batelada, através de processo fermentativo com alto rendimento utilizando microrganismos do gênero *Bacillus* sp. A abordagem da pesquisa centra-se na busca de estratégias alternativas de obtenção de PHA visando suplantiar o aspecto custo no desenvolvimento desses materiais com foco na redução de etapas e baseado no ciclo de vida dos produtos gerados.

3 OBJETIVO GERAL

Investigar a potencialidade da produção de biopolímeros biodegradáveis (PHAs) a partir de resíduos agroindustriais por cultivos microbianos combinados em processo fermentativo simplificado em batelada

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar o processo de fermentação mais adequado aos microrganismos e resíduos que apresente menor custo e maior rendimento;
- Ajustar os processos de extração e purificação dos PHAs com foco em química verde;
- Correlacionar as propriedades estruturais, texturais e térmicas dos biopolímeros puros e em blendas com PLA para aplicações específicas;
- Otimizar os processos fermentativos para produção em batelada com alto rendimento reacional escalonando o processo da bancada até biorreator em escala piloto;
- Avaliar o processo do PHA produzido da origem da matéria-prima até o final de ciclo de vida.

4 PARTE EXPERIMENTAL

O trabalho foi desenvolvido em quatro etapas principais, conforme o mostrado no Esquema 1.

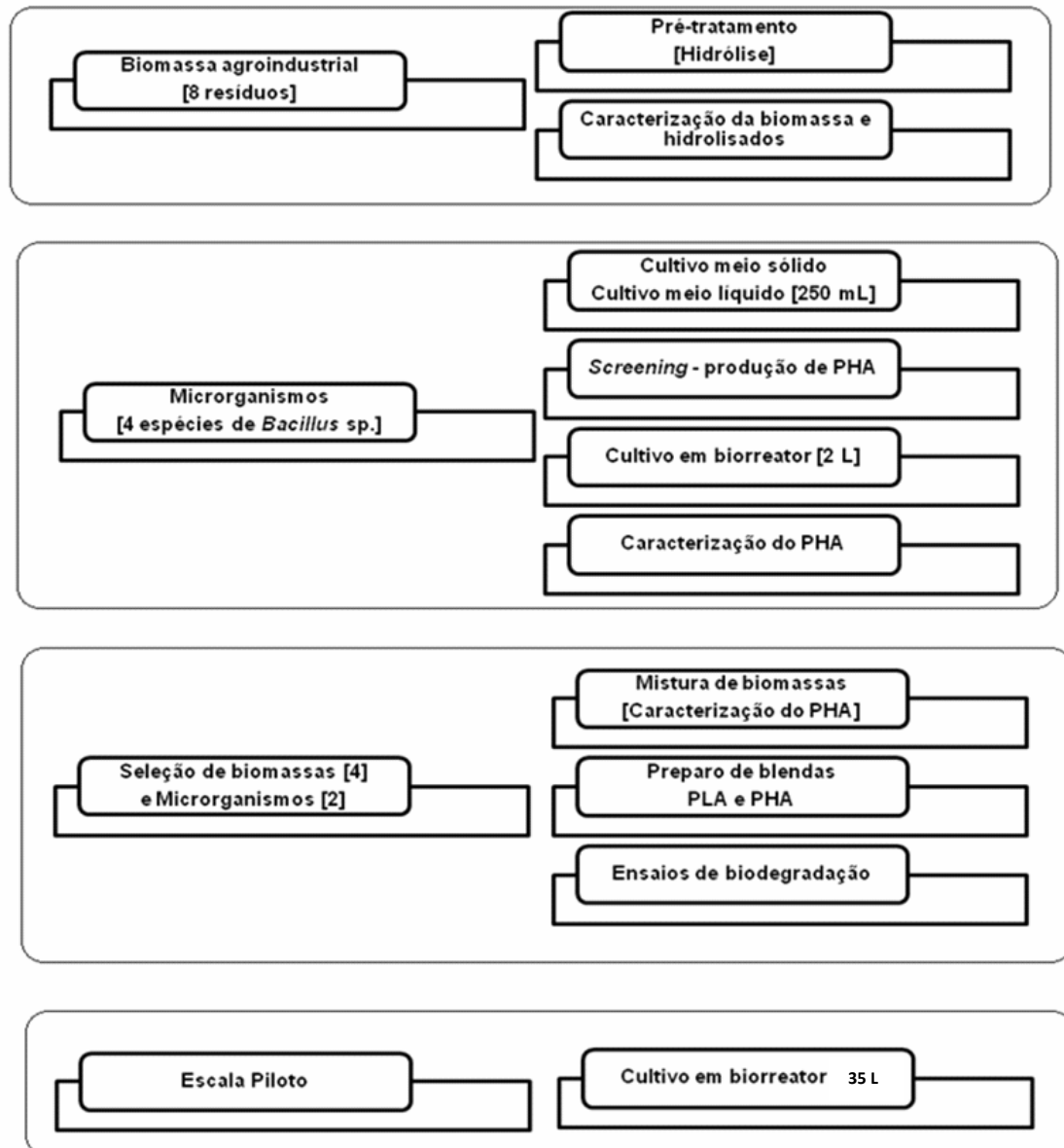


Figura 4 Esquema 1 Resumo das principais etapas realizadas neste estudo

A primeira etapa foi de prospecção de diferentes biomassas agroindustriais (8 tipos), definição dos processos de hidrólise para o preparo dos meios de cultivo seguido da ativação e crescimento dos microrganismos em meio sólido (*screening* ou *triagem*) e líquido (250 mL). Cultivo em biorreator de bancada de 2 L, extração,

purificação e caracterização do PHA com determinação das curvas de crescimento e capacidade de acúmulo de PHA. As melhores biomassas (4 tipos) e microrganismos (2 espécies) foram selecionados e testados em diferentes combinações para caracterização do PHA obtido. Preparo de filmes e blendas de PHA e PLA comercial foram testados para avaliar a miscibilidade entre eles e para ensaios de biodegradação/toxicidade dos biopolímeros obtidos.

4.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

- Casca de arroz (*Oryza sativa L.*), provenientes do Sindicato dos Trabalhadores Rurais de Santo Antônio da Patrulha, RS; é um subproduto do beneficiamento de arroz correspondendo em torno de 22% em relação ao grão, utilizada na alimentação de fornalhas e autoclaves da própria indústria arroseira produção de energia.
- Casca de banana variedade prata (*Musa paradisiaca L.*), proveniente da empresa Da Colônia, Santo Antônio da Patrulha, RS; proveniente da agroindústria é um material biodegradável com baixo custo e um adsorvente natural para metais pesados.
- Fibra de coco (*Cocos nucifera*) comercial Golden Mix (Amafibra - Fibras e Substratos Agrícolas da Amazônia, Holambra, SP); extraído do mesocarpo dos frutos. Possui características como: coloração uniforme, alta elasticidade e resistência à tração e umidade o que lhe confere aplicações na indústria como material de reforço e como isolante acústico e térmico.
- Talo longo de fumo variedade Virgínia (*Nicotiana tabacum*), subproduto do processamento de fumo da indústria de cigarros, proveniente da empresa Souza Cruz S.A., Santa Cruz do Sul, RS, resultante do beneficiamento das folhas do fumo. Os talos representam cerca de 4% do peso total do tabaco.

- Bagaço de cana de açúcar (*Saccharum spp.*), subproduto do processo de extração para a retirada do sumo, obtido no Mercado Público Municipal de Porto Alegre. É utilizado como fonte de energia na alimentação de caldeiras, produção de papel, aglomerados e ração animal.
- Farelo de trigo (*Triticum spp.*) residual de produção de farinha de trigo, proveniente do Moinho Estrela, Canoas, RS; composto principalmente de pericarpo, partículas finas do gérmen e das camadas internas dos grãos de trigo, bem como outros resíduos do processamento.
- Casca de Acácia (*Acacia mearnsii*) proveniente da empresa Tanac S.A., Montenegro, RS; resíduo gerado após extração de taninos por esgotamento, geralmente destinados para geração de energia em caldeiras.
- Pele de Amendoim (*Arachis hypogaea*) proveniente da empresa Da Colônia, Santo Antônio da Patrulha, RS; subproduto que representa cerca de 3% em massa desta oleaginosa tem aplicação limitada para uso em ração animal.

4.2 MICRORGANISMOS

Todos os microrganismos foram obtidos de isolados do Instituto de Ciência e Tecnologia ICTA/UFRGS:

- *Bacillus subtilis* ATCC 19659
- *Bacillus cereus* ATCC 9634
- *Bacillus licheniformis* (P40) isolado do conteúdo intestinal do peixe teleósteo *Leporinus* sp. da bacia amazônica no centro da Amazônia, Brasil (3° 06'S, 60°01'W), doados pela Universidade Federal do Amazonas.
- *Bacillus amyloliquefaciens* (LBM 5006) foi isolado da Mata Atlântica brasileira e caracterizado como descrito por Lisboa, 2006⁶⁶.

4.3 CULTIVO E MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS

O Esquema 2 apresenta as etapas de cultivo e manutenção dos microrganismos durante os bioprocessos.

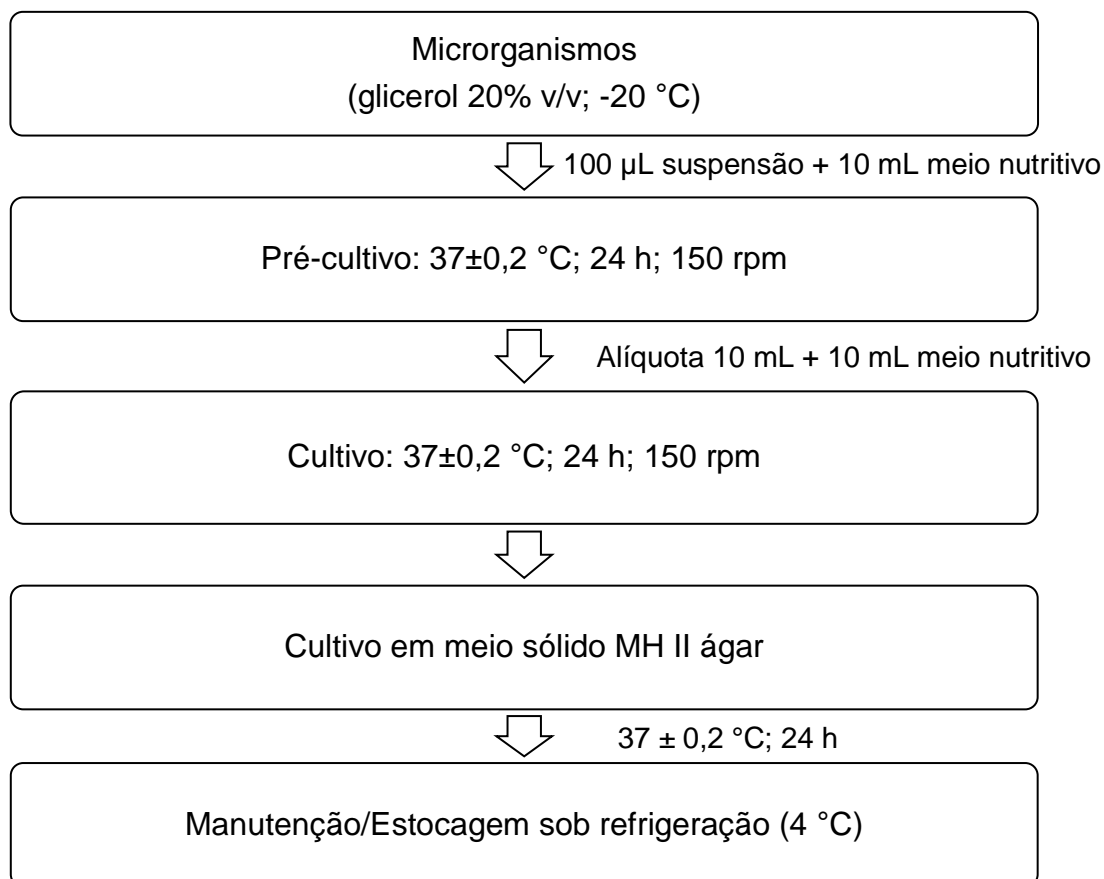


Figura 5 Esquema 2 Etapas para cultivo e manutenção dos microrganismos

As células em suspensão conservadas em glicerol (20% v/v) e estocadas em freezer a -20 °C foram inoculadas em caldo nutritivo e posteriormente em placas, sendo semeada periodicamente. Todas as atividades de preparação dos microrganismos foram realizadas em ambiente estéril em Câmara de Fluxo Laminar Vertical – Pachane – PA - 115 seguindo protocolos e metodologias microbiológicas básicas da Fiocruz ⁶⁷.

Uma alíquota de 0,1 mL de células em suspensão de glicerol foi previamente cultivada em tubos de ensaio com 10 mL de caldo nutritivo Brain Heart Infusion (BHI), um meio derivado de nutrientes de cérebro e coração, peptona e dextrose

(Merck) dissolvido em água destilada na concentração de 36 g.L^{-1} e esterilizado em autoclave $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min. A cultura foi mantida sob agitação a 150 rpm a $37\pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h em Incubadora com Agitação Orbital MA 410. Após o primeiro crescimento foram inoculados 0,1 mL desta suspensão em 10 mL de caldo nutritivo estéril e novamente cultivados por mais 24 h a $37\pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação de 150 rpm. Posteriormente foi preparado o meio Agar Mueller Hinton (MH II) composto por: caldo nutritivo de carne (30%), caseína hidrolisada (1,75%), amido (0,15%), ágar-ágar (1,7%) (Kasvi) dissolvido em água destilada na concentração de 38 g.L^{-1} , esterilizado a 121°C por 15 min e distribuído em placas de Petri estéreis para o cultivo em meio sólido. As placas foram inoculadas com a suspensão de células utilizando-se haste estéril tipo Swab e os cultivos crescidos em estufa incubadora por 24 h a $37\pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$. As placas cultivadas foram mantidas refrigeradas ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) até sua utilização e repicadas periodicamente para sua manutenção.

4.4 PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO LÍQUIDO – HIDRÓLISE

O Esquema 3 mostra as etapas de preparação da biomassa agroindustrial para utilização como meio de cultivo dos microrganismos e produção do PHA.

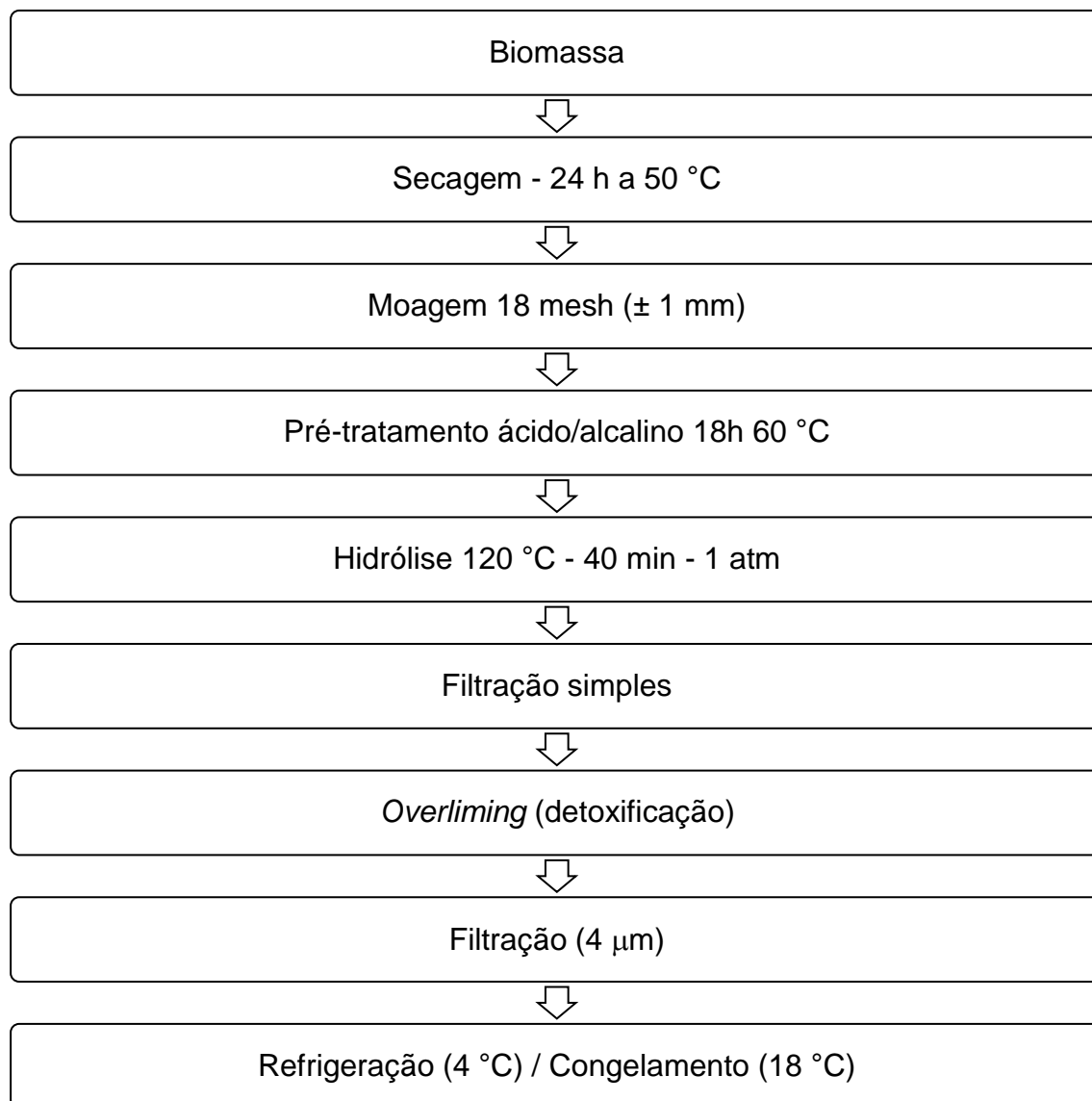


Figura 6 Esquema 3 Preparo da biomassa para obtenção dos meios hidrolisados

Conforme ilustrado no Esquema 3, os resíduos secos em estufa 50 °C por 24 h foram moídos e peneirados até um tamanho de partícula de cerca de um mm e estocados em condições secas até sua utilização. O teor de umidade de cada resíduo foi determinado gravimetricamente após secagem a 100±2 °C até peso constante⁶⁸. As hidrólises ácida e alcalina foram realizadas seguindo protocolo

adaptado ⁶⁹. A 5 g de biomassa seca foram adicionados 100 mL de solução de hidrólise em frasco com tampa de rosca. As soluções de hidrólise testadas foram: ácido sulfúrico (H₂SO₄) e hidróxido de sódio (NaOH) preparadas na concentração de 0,75%. A mistura foi mantida em banho de silicone a 60 °C por 18 h e foi posteriormente autoclavada por 40 min a 120 °C, 1,1 atm. Depois de resfriados em temperatura ambiente, os meios hidrolisados foram filtrados. Alíquotas da fração líquida foram mantidas refrigeradas (4 °C) e o material sólido residual foi lavado com água deionizada, prensado e seco para caracterização e reaproveitamento. Os hidrolisados passaram ainda por um processo de *overliming*¹ modificado⁷⁰, onde o pH foi elevado a 10 com NaOH e mantido por 4 horas sob agitação a 60°C ⁷¹. Possíveis compostos tóxicos foram separados por decantação seguidos de filtração (4 µm). O pH foi corrigido até 7,0 ± 0,2 com H₂SO₄ concentrado em todas as amostras. Este procedimento possibilita que a lignina solúvel possa ser medida sem a interferência de possíveis compostos fenólicos formados. As frações de lignina solúvel e insolúvel foram medidas por absorvância no UV vis (λ= 200-400 nm) e calculada conforme as Equações 1 e 2 ^{72,73}:

$$\% \text{ Li} = \frac{m1}{m2} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

onde,

%Li = lignina insolúvel na amostra (%);
 m1 = massa de resíduo (g), base seca; e
 m2 = massa da amostra (g), base seca.

$$\text{Ls} = \frac{4,53 \cdot A_{215} - A_{280}}{300} \quad \text{Equação 2}$$

onde, Ls = concentração em g.L⁻¹ de lignina na amostra; A₂₁₅ = absorvância da solução a 215 nm;
 eA₂₈₀ = absorvância da solução a 280 nm.

4.5 PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO SÓLIDO

¹

Overliming – termo utilizado para processos de detoxificação de extratos líquidos resultantes da hidrólise ácida de compostos lignocelulósicos através da elevação do pH e posterior neutralização.

A avaliação inicial do uso dos meios hidrolisados como fonte de nutrientes para os microrganismos foi realizada com testes em meios solidificados com Agar em placas de Petri seguindo as etapas mostradas no Esquema 4.

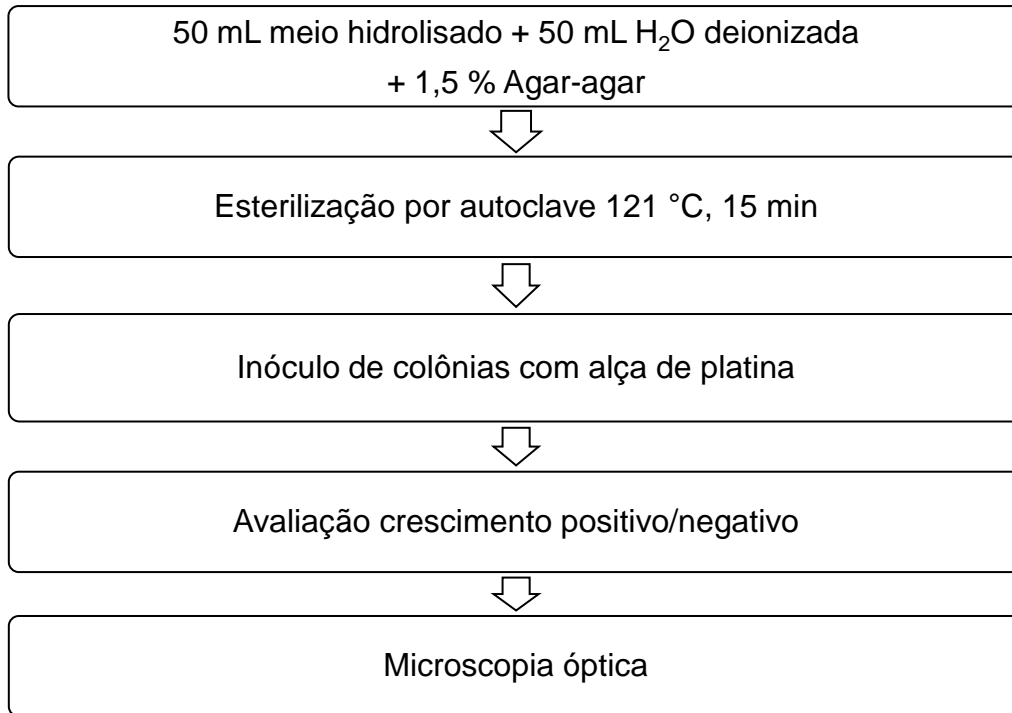


Figura 7 Esquema 4 Cultivo de microrganismos em meio sólido

Conforme ilustrado no Esquema 4, em 50 mL de meio hidrolisado foram adicionados 50 mL de água destilada e adicionados 1,5% (p/v) de Agar-agar em Erlenmeyer de 250 mL, pré-aquecido e esterilizado por 15 min a 121 °C e resfriados até 60 °C. Em torno de 25 mL de meio foi vertido em placa de Petri totalizando seis placas de cada meio hidrolisado para cada microrganismo testado. Cada placa foi inoculada com três a cinco colônias de microrganismos das placas pré-cultivadas em meio sólido Mueller Hinton II, com uso de alça de platina estéril em Câmara de Fluxo Laminar Vertical – Pachane - PA – 115. As placas foram incubadas invertidas em estufa incubadora De Leo a 37±0,2 °C por 24 e 48 h. O crescimento foi analisado visualmente indicando crescimento positivo ou negativo. Foram preparadas placas de controle sem inóculo para controle da esterilização dos meios.

4.6 CULTIVO DOS MICRORGANISMOS EM MEIO LÍQUIDO

O Esquema 5 mostra a sequência de etapas para o cultivo dos microrganismos em meio líquido em agitador orbital considerando algumas condições específicas por microrganismo. Nesta etapa não foram feitos controles de pH e de aeração em nenhum dos ensaios.

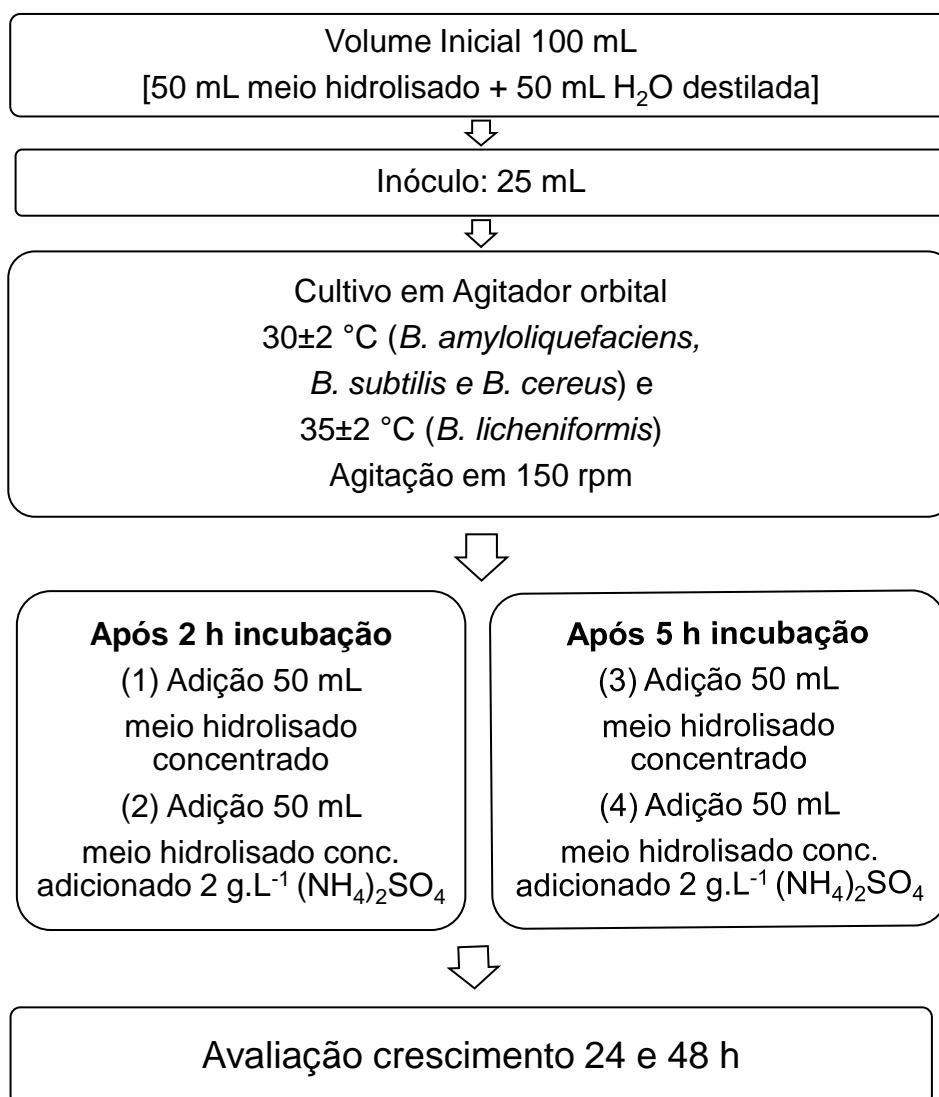


Figura 8 Esquema 5 Etapas para o cultivo de microrganismos em meio líquido

De acordo com o Esquema 5, foi preparado um pré-inóculo de microrganismos em frasco tipo Erlenmeyer de 250 mL adicionando-se em 100 mL de meio hidrolisado e uma alçada de células das placas cultivadas em meio sólido. A cultura foi incubada por 24 h em incubadora com Agitação Orbital MA 410 a 150 rpm

por 18 h a 37°C. Após o crescimento, uma alíquota de 25 mL deste pré-inóculo ajustado para uma concentração de células $3 \cdot 10^8$ (0,3 índice de turbidez McFarland²) foi adicionada em 50 mL de cada meio hidrolisado diluído com a adição de 50 mL de água destilada em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL, pré-esterilizados por 15 min a 121 °C e resfriados até temperatura ambiente. Os frascos foram cultivados por 48h a 150 rpm a $32 \pm 0,2$ °C (*B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e *B. cereus*) e 35 ± 2 °C para (*B. licheniformis*) com pH inicial 7. O cultivo em agitador orbital foi repetido para todos os meios hidrolisados adicionando-se: após 2 horas nos ensaios ((1) e (2)) ou, após 5 horas nos ensaios ((3) e (4)): 50 mL de meio hidrolisado concentrado puro ou 50 mL de meio hidrolisado enriquecido com 2 g.L^{-1} de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, totalizando um volume final de meio de cultivo de 175 mL. Foram coletadas amostras de 2 mL em frascos tipo Eppendorf nos tempos: 0, 30 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 12h, 24h, 30h e 48h. As amostras foram congeladas para análise posterior da densidade celular, microscopia óptica e para análise de extração e quantificação dos biopolímeros. Os experimentos foram realizados em duplicata totalizando 64 ensaios. O método de densidade óptica não permite distinguir entre células viáveis e células mortas e não permite obter diretamente valores absolutos da concentração de células, sendo especialmente utilizado quando se pretende confirmar se uma dada cultura se encontra em crescimento ou para acompanhar o crescimento microbiano com base no aumento da densidade óptica (DO) medida a um comprimento de onda 600 nm.

A determinação da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foi obtida na fase exponencial de crescimento das medidas da densidade óptica e determinada através da construção do gráfico do logaritmo da absorbância em função do tempo (t) e depois obtida do coeficiente angular da reta ajustada aos dados experimentais, Equação 3^{74,75}.

$$\ln(\text{abs}) = \mu_{\text{máx}} \cdot t \quad \text{Equação 3}$$

As quatro cepas de *Bacillus* foram cultivadas em duas etapas para examinar o efeito de limitação de nitrogênio e síntese de PHA em meios de controle. As células

² A escala nefelométrica de McFarland é o padrão de turvação mais frequentemente utilizado nos laboratórios de microbiologia, para determinar a intensidade da multiplicação em meios de cultivo líquidos. Esta multiplicação se manifesta nos meios líquidos por um aumento das partículas (bactérias) que se opõem a livre passagem da luz, provocando turvação ou opacidade no meio. Quanto maior o número de bactérias, maior será a opacidade do meio de cultura⁶⁷.

foram pré cultivadas em frascos de 250 ml contendo 50 ml de caldo nutritivo Mueller Hinton composto por: peptona de carne (2 g.L^{-1}), caseína hidrolisada ($17,5 \text{ g.L}^{-1}$) e amido ($1,5 \text{ g.L}^{-1}$) por 18 h a 37°C . As células foram então cultivadas sob duas condições diferentes: condições suficientes e limitadas em nitrogênio.

Em frascos de 250 mL foram adicionados 100 mL de meio nutritivo e 25 mL do pré inóculo e para culturas com nitrogênio suficiente, Glicose D anidra e sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ PA Synth foram suplementados com concentrações finais de 5 e 2 g.L^{-1} , respectivamente na segunda etapa. Para culturas limitadas de nitrogênio, a Glicose D anidra foi suplementada a uma concentração de 5 g.L^{-1} e o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ não foi adicionado. Os meios de reforço foram adicionados nos mesmos tempos utilizados com os meios hidrolisados dos resíduos, sendo: após 2 ou 5 horas a partir do inóculo: foram adicionados 50 mL de meio nutritivo puro enriquecido somente com 5 g.L^{-1} de glicose ou 50 mL de meio nutritivo enriquecido com 5 g.L^{-1} de glicose e 2 g.L^{-1} de sulfato de amônio, totalizando um volume final de meio de cultivo de 175 mL. Foram coletadas amostras de 2 mL em frascos tipo Eppendorf nos tempos: 0, 30 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 12h, 24h, 30h e 48h. Os frascos foram cultivados por 48h a 150 rpm a $32 \pm 0,2^\circ\text{C}$ (*B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e *B. cereus*) e $35 \pm 2^\circ\text{C}$ para (*B. licheniformis*) com pH inicial 7.

4.7 CULTIVO EM BIORREATOR

Após avaliação dos ensaios em agitador orbital com volumes de 250 mL, as rotas que apresentaram maior rendimento em biopolímero foram reproduzidas, nas mesmas condições já descritas, como mostrado no Esquema 6. A aeração foi mantida constante em $4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ e o pH não foi ajustado.

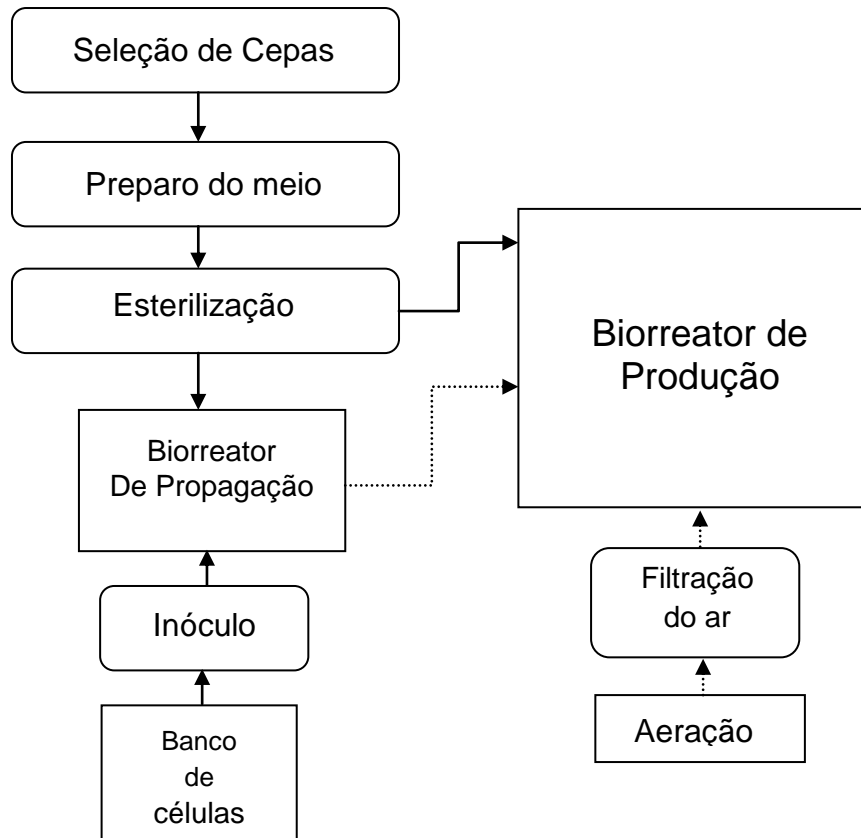


Figura 9 Esquema 6 Etapas para o cultivo em Biorreator

Conforme representado no Esquema 6, as cepas dos microrganismos foram selecionadas e inoculadas em 125 mL de meio hidrolisado estéril e pré-incubadas em um biorreator de propagação de 250 mL por 18 h, $37 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$, 150 rpm em agitador orbital. Após a incubação, o inóculo foi transferido para um balão de três bocas com capacidade de 2 L contendo 1 L de meio hidrolisado em temperatura de $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ou $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. A temperatura do biorreator foi mantida estável em banho de silicone adaptado sobre um agitador magnético aquecido com controlador digital de temperatura durante todo o processo. As três aberturas do balão foram mantidas

fechadas por septos de borracha adaptando-se: uma entrada para termômetro na parte superior mergulhado diretamente no meio de cultivo, uma entrada para mangueira do aerador com capacidade de 4 L.min⁻¹, com filtro 0,22 µm na entrada de ar para evitar contaminações externas e, a terceira abertura fechada com septo de borracha com uma mangueira de 5 mm de diâmetro adaptada para coleta de amostras com seringa. O biorreator foi realimentado com 500 mL de meio hidrolisado concentrado puro enriquecido com 2 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ após 2 ou 5 h, totalizando um volume final de meio de cultivo de 1,625 L. A circulação do meio de cultivo no biorreator foi realizada pela bomba de aeração e eventualmente por breve agitação manual. Amostras de 2 e 5 mL foram coletadas a cada 2 h nas primeiras 12 h e depois em 24 e 48 h para análise da densidade da biomassa e quantificação de biopolímero.

Para escala piloto em biorreator piloto foi utilizado fermentador de inox 321 (tipo cervejeiro) com capacidade de volume total de 47,6 L com fundo triplo. O preparo do meio de cultivo e inóculo do microrganismo seguiram as mesmas etapas dos ensaios em bancada com: volume inicial de 25 L de meio hidrolisado, 5 L de pré-inóculo do microrganismo e 5 L de meio de reforço após 5 h com meio hidrolisado concentrado e enriquecido com 2 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ e, totalizando 35 L de volume final. A circulação do meio de cultivo foi realizada manualmente e com auxílio de bomba de circulação adaptada na lateral do biorreator. O cultivo se manteve em temperatura ambiente e estável a 32°C com uso de chapa de aquecimento adaptada na base do biorreator. Os meios hidrolisados testados em biorreator piloto foram definidos a partir dos melhores resultados da etapa de bancada.

4.8 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS

As etapas de extração e purificação dos biopolímeros da biomassa são mostradas no Esquema 7 (a) extração com hipoclorito de sódio/acetona e (b) extração com carbonato de polipropileno (CP).

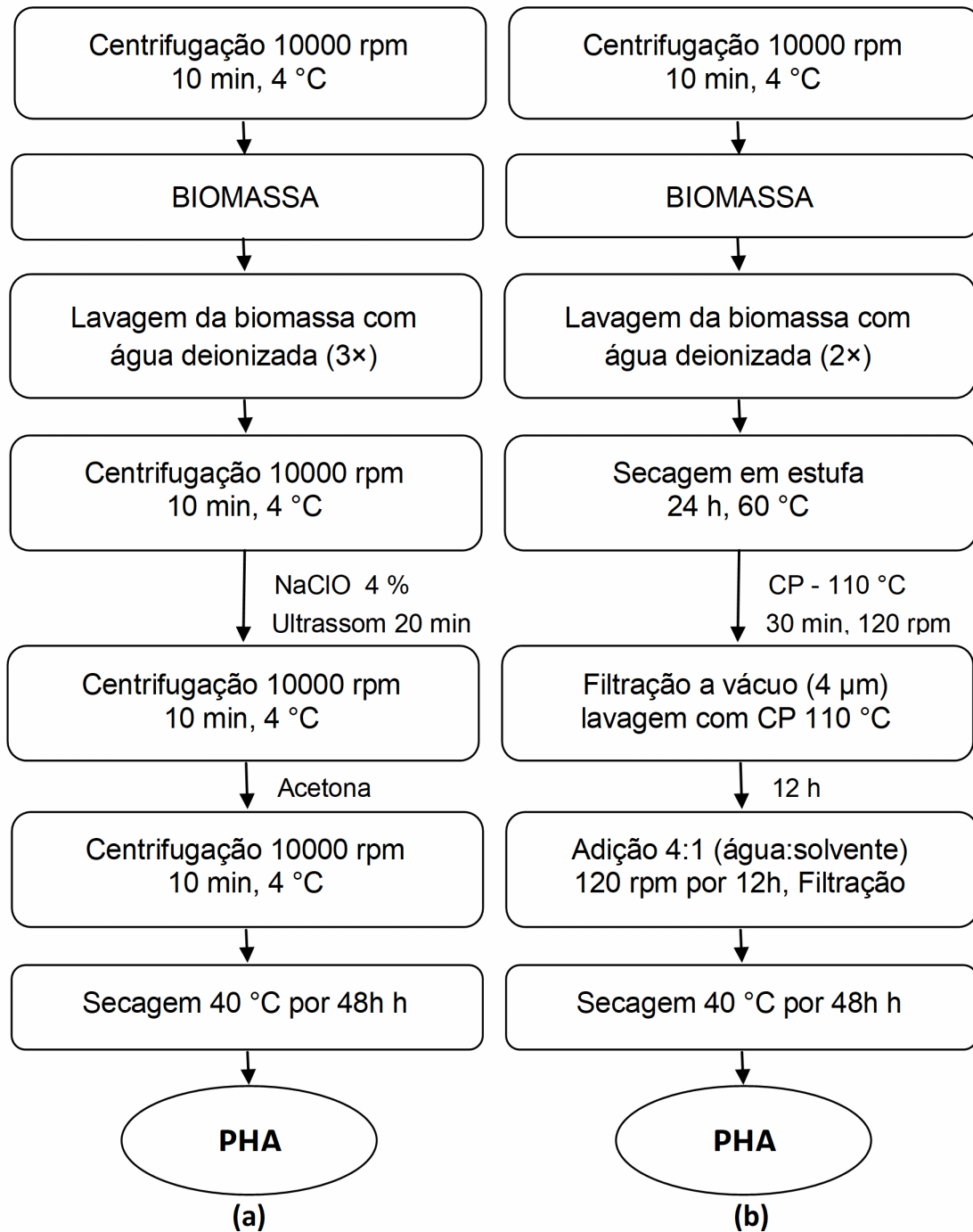


Figura 10 Esquema 7 (a) Etapas para extração e purificação do PHA com hipoclorito de sódio e acetona e (b) extração com carbonato de polipropileno

Os dois tipos de extração foram realizados sendo a extração com carbonato de polipropileno somente realizada nos cultivos obtidos em biorreator de 2 L. Conforme ilustrado no Esquema mostrado em 7(a), a biomassa foi transferida para tubos tipo Falcon de 50 mL, centrifugada e lavada por três vezes com água deionizada e recuperada por centrifugação por 10 min a 10000 rpm e 4 °C. O rompimento das células para extração dos biopolímeros foi obtida com a adição de hipoclorito de sódio (NaClO) diluído em água deionizada a 4% (v/v) sob agitação em ultrassom por 10 min, seguida de centrifugação por 10 min a 10000 rpm e 4°C seguindo metodologia química de extração modificada⁷⁶. A biomassa foi novamente lavada e centrifugada com água deionizada para eliminar resíduos de NaClO. Na biomassa resultante foi adicionado acetona PA para purificação final dos biopolímeros e o biopolímero precipitado foi recuperado posteriormente por centrifugação. Os biopolímeros foram secos em estufa a 40 °C por 48h.

Seguindo o fluxograma do Esquema 7 (b): ao final do cultivo, as células foram separadas por centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. A biomassa foi lavada duas vezes com água destilada e seca em estufa a 40 °C por 24 h. Para a recuperação do biopolímero, foi utilizado o método modificado de extração com carbonato de polipropileno^{23,77}: A biomassa seca (3 g) foi suspensa em 50 mL de carbonato de propileno aquecido a 110 °C por 30 minutos em aparelho de vidro fechado sob constante agitação a 120 rpm. A suspensão (carbonato de propileno, detritos celulares e biopolímero) foi submetida à filtração a vácuo em aparato de filtração de vidro em filtro de papel qualitativo 80 g.m⁻² e 12,5 cm de diâmetro. Os resíduos de células e precipitados retidos no filtro foram lavados a seguir com 100 mL de carbonato de polipropileno aquecido à mesma temperatura de extração (110 °C). O filtrado contendo biopolímero, dissolvido em solvente, foi deixado em repouso por 12 h à temperatura ambiente. Depois disso, foi adicionada água destilada na proporção de 4:1 (água:solvente) para precipitar o polímero, e a suspensão foi agitada constantemente por 12 h. Subsequentemente, a suspensão foi submetida a uma segunda filtração à temperatura ambiente. O material polimérico retido no filtro foi lavado com 200 mL de água deionizada e o filtro contendo a massa polimérica foi seco em estufa a 40 °C por 48 h.

4.9 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

4.9.1 Carbono Fixo, Voláteis e Teor de Cinzas

Aproximadamente 2 g de cada resíduo agroindustrial foram triturados, misturados e secos a $100 \pm 0,2$ °C em estufa conforme definido na norma ASTM D 3173-17⁷⁸ até peso constante utilizando balança analítica (sensibilidade 0,01 g) determinando assim o percentual de umidade = $[\text{massa seca (g)} / \text{massa úmida (g)}] \times 100$. As amostras foram então trituradas e peneiradas em peneira com abertura 18 mesh em um tamanho aproximado de 1000 μm para futuras análises químicas e físicas. Todas as análises foram realizadas em triplicata e seguindo a norma da ASTM D7152-10⁷⁹ foram determinados os conteúdos em porcentagem de massa de carbono fixo, voláteis e cinzas.

4.9.2 Análise Elementar (CHN)

A análise elementar (CHN) foi realizada na Central Analítica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, utilizando um analisador elementar Perkin Elmer CHN 50 PE 2400 – II que forneceu os percentuais de cada elemento: C, H e N. O conteúdo de oxigênio foi obtido de maneira indireta por diferença: $\%O = 100 - (N+H+C)$. A partir destes dados ainda foram determinadas as proporções atômicas: C/N, H/C e O/C e (O+N)/C índice de polaridade.

4.9.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

Análise de TGA foi realizada em equipamento Thermal Analyzer Q50 (TA Instruments), LAMAT- UFRGS, em atmosfera inerte utilizando fluxo de nitrogênio de $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Cerca de 5 mg de amostra foi adicionada diretamente na balança do equipamento e a análise seguiu roteiro padrão com taxa de aquecimento de $20 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ de 25 °C até 600 °C. Os dados foram coletados em software do próprio equipamento.

4.9.4 Adsorção de Nitrogênio

Técnicas para análise de textura e porosidade foram realizadas no IQ-UFRGS por adsorção de nitrogênio em equipamento Micromeritics Tristar II 3020 (Norcross, GA, EUA). A biomassa foi pré-tratada por desgaseificação a 100 °C por 24 h sob vácuo. A área específica foi determinada pelo método Brunauer-Emmett-Teller (BET) na faixa de $0,01 < P < P_{atm}$ a $T = -196$ °C. Os diâmetros médios dos poros e sua distribuição foram calculados pelo método de Barrett-Joyner-Halenda (BJH) e considerando os padrões da isotérmica de dessorção de Halsey⁸⁰. Foram realizadas análises das biomassas agroindustriais e dos biopolímeros obtidos utilizando cerca de 200 mg de amostra em cada ensaio.

4.9.5 Espalhamento de Raios X a baixo ângulo (SAXS)

Análises de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil) em uma linha de feixe D11 A usando o comprimento de onda $\lambda = 1488$ nm. O feixe de raios X foi selecionado por um monocromador de silício e foi colimado usando a geometria do sistema com uma geometria do tipo orifício. A análise SAXS foi realizada utilizando uma rotina de avaliação implementada no software IRENA Igor Pro (Wavemetrics, Portland, EUA)⁸¹. Um ajuste multinível unificado foi usado para descrever um ou dois níveis da organização estrutural revelada nos dados de dispersão. Os valores do raio de rotação (Rg) e do decaimento exponencial (P) definem o tamanho, a forma e a distribuição fractal das partículas^{82,83}. Os resultados obtidos das análises de adsorção de nitrogênio e de SAXS das biomassas foram comparados com os rendimentos obtidos após hidrólise.

4.9.6 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

As análises por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas em um espectrofotômetro Shimadzu Prestige 21 no modo de absorvância e transmitância. As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr e medidas com resolução de 4 cm^{-1} em 32 varreduras na faixa de $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$. As amostras também foram analisadas no modo ATR em um equipamento Alpha P-

Bruker com as biomassas e biopolímeros em forma de pó e nas blendas de PHA/PLA em filmes nos ensaios de biodegradação.

4.10 COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO

4.10.1 Teor de Lignina Solúvel

O teor de lignina solúvel foi analisado por espectroscopia UV vis em equipamento Cary Varian 100 por varredura na faixa de $\lambda = 200-400$ nm seguindo protocolo adaptado para o tipo de biomassa ⁸⁴. As medidas de absorbância foram realizadas em triplicata sendo os resultados comparados a uma curva com diferentes concentrações das biomassas nos processos de hidrólise e calculada como descrito no item 4.4.

4.10.2 Açúcares Redutores Totais

Dentre os açúcares redutores, duas hexoses são particularmente importantes: a glicose e a frutose. Esses carboidratos são dois dos principais monossacarídeos presentes em processos fermentativos e um método colorimétrico foi utilizado para a determinação de açúcares redutores utilizando o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) como agente oxidante ^{85,86}. O método foi utilizado no acompanhamento do processo de fermentação permitindo verificar as taxas de consumo dos açúcares pelo microrganismo, necessário para a compreensão da cinética do bioprocessos. As medidas de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro Cary Varian 100.

4.10.3 Carbono Orgânico e Nitrogênio Total

As amostras dos meios hidrolisados foram diluídas em água Milli-Q 1:1000 para que as concentrações de ácidos, bases ou sais fossem reduzidas para 1000 mg.L⁻¹ e filtradas em membrana 0,22 μ m. A quantificação de carbono orgânico, inorgânico e nitrogênio foi obtida em equipamento Analytik Jena Multi N/C 2100S com leituras em triplicata. Foram obtidas as frações de: carbono total (TC), carbono inorgânico (IC), carbono orgânico total (TOC) e carbono orgânico não purgável

(NPOC). O equipamento utiliza o método de oxidação por combustão catalítica na temperatura de 680 °C após acidificação da amostra com ácido clorídrico.

4.11 BIOMASSA MICROBIANA

A densidade óptica do meio de cultura foi determinada por turbidimetria a 600 nm (OD_{600}) em Espectrofotômetro Shimadzu – UV mini – 1240 utilizando cubeta de passo óptico de 10 mm e o meio de cultivo inicial sem inóculo como referência. A determinação da massa seca consistiu na coleta de amostras de 2 e 5 mL do meio de cultivo que foi centrifugado, a biomassa lavada com água deionizada, novamente centrifugada e colocada em estufa a 60°C até peso constante. O total das amostras não excedeu 10% do volume total do cultivo. Os cultivos foram realizados em triplicata e empregado para as quatro cepas testadas em todos os meios hidrolisados.

4.12 MICROSCOPIA ÓPTICA

Uma alíquota de 100 μ L da suspensão de células foi cuidadosa e uniformemente depositada em uma lâmina de vidro, fixada por aplicação de calor e depois corada com uma solução de corante Sudan Black B a 3% (p/v em etanol a 70%) por 10 min. A lâmina foi então imersa em xileno até ser completamente descorada. A amostra foi contrastada com corante Safranina (5% p/v em água deionizada) por 10 s, lavada novamente com água destilada e seca. Adicionou-se gotas de óleo de imersão (Nujol) diretamente à lâmina completamente seca, as células foram examinadas por microscopia óptica em um microscópio Olympus CX 40 com ampliação total de 100 a 400 x, bactérias exibindo grânulos de cor azul escura foram identificadas como acumuladoras de PHA intracelulares²⁴.

4.13 CROMATOGRAFIA POR PERMEÇÃO EM GEL

A determinação das diferentes massas molares e a distribuição do peso molecular dos biopolímeros foram realizadas por cromatografia de permeação em gel em um cromatógrafo de exclusão por tamanho Viscotek, consistindo em um módulo Max VE-2001 GPC e colunas SB-807 HQx2 e SB- 806M HQ. Amostras de biopolímeros (~20 mg) foram solubilizadas em 2 mL de clorofórmio a 60 °C e

filtradas em membrana 0,22 μm antes das medições. As análises foram realizadas na Central Analítica do IQ – UFRGS.

4.14 ANÁLISES TÉRMICAS

Análises térmicas foram realizadas por calorimetria diferencial de varredura em equipamento DSC-Q20 (TA Instruments) complementado por análise termogravimétrica realizada no Thermal Analyzer Q50 (TA Instruments). Para DSC foram utilizadas panelinhas herméticas de alumínio preparadas e fechadas com massa de PHA em torno de 10 mg e rotina de aquecimento e resfriamento 20 $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ até 170 $^{\circ}\text{C}$ e resfriamento até 25 $^{\circ}\text{C}$. O segundo aquecimento foi até 200 $^{\circ}\text{C}$ na mesma taxa de 20 $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$. Análise de TGA seguiu roteiro padrão com taxa de aquecimento de 20 $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ iniciando em 25 $^{\circ}\text{C}$ até 800 $^{\circ}\text{C}$ em atmosfera inerte sob fluxo de nitrogênio de 50 $\text{mL}.\text{min}^{-1}$.

4.15 ESPECTROMETRIA DE MASSA

A espectrometria de massa foi realizada pela técnica de ionização por dessorção a laser assistida por matriz, seguido pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo, MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight), no IQ – UFRGS, usando um espectrômetro Autoflex III (Bruker Daltonics) equipado com um refletor de modo positivo, matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (α -CHCA), 0,1% de ácido trifluoracético (TFA) a 0,1% (70:30, v/v) como solvente e solução de cationização (NaCl , 10 $\text{mg}.\text{mL}^{-1}$) combinadas na razão de volume 10:1:1. As amostras de biopolímeros (~20 mg) foram dissolvidas em água Milli-Q a 60 $^{\circ}\text{C}$.

4.16 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (^1H e ^{13}C)

Uma amostra de biopolímero (~20 mg) foi dissolvida em 1,5 mL de clorofórmio deuterado (CDCl_3). Os espectros de ^1H RMN foram medidos em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) Bruker Ascend 400 MHz FT, e os espectros de ^{13}C RMN foram registrados em 400 MHz. Os desvios químicos foram relatados em ppm a partir do tetrametilsilano (TMS) como referência interna. As

análises foram realizadas na central analítica do IQ-UFRGS e os espectros foram editados utilizando software MestReNova[®] versão 6.0 e Origin 8.5.

4.17 MICROSCOPIA CONFOCAL DE VARREDURA A LASER (CSLM)

A microscopia confocal de varredura a laser foi realizada usando um microscópio Spectral Olympus FV1000 equipado com quatro lasers de fase sólida, no CME – UFRGS. A análise topográfica das amostras sólidas foi realizada com aumento de 1 a 50 x. As amostras de biomassa microbiana foram coradas com o marcador fluorescente vermelho do Nilo (1 mg / mL em metanol) fixadas em lâmina de vidro e cobertas com óleo de imersão (Nujol) e com uma lamínula de vidro. As imagens foram processadas usando o software do equipamento FV1000 e a fluorescência registrada em 559 nm.

4.18 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As micrografias foram obtidas em um microscópio JEOL - JSM 6060, operado em tensão de 10 kV, gerando imagens eletrônicas secundárias com resolução de imagem pontual de 3,5 nm. Uma pequena quantidade de amostra do biopolímero ou da biomassa em pó foi previamente fixada em fita de carbono e metalizada com ouro. As micrografias foram registradas em diferentes ampliações de 1000 a 5000 x. Amostras em forma de filmes e blendas de PHA/PLA também foram analisadas durante os ensaios de biodegradação. As análises foram realizadas no CME – UFRGS.

4.19 PERFILOMETRIA ÓPTICA

Os filmes de PHA e blendas foram avaliados em Perfilômetro Óptico 3D BRUKER, Configuração GTK M, Contour GTK (Série GTK 14-0147/2014), IQ – UFRGS, permitindo medir a espessura dos filmes e rugosidade em escala nanométrica em imagens superficiais 2D e 3D. Os filmes foram fixados em lâminas de vidro. As informações de rugosidade da superfície foram avaliadas entre os filmes

puros de PLA e PHA e das blendas preparadas para uma análise qualitativa dos filmes. Os filmes foram preparados por “*casting*”, método de evaporação de solvente e as blendas preparadas na proporção (1:1).

4.20 ÂNGULO DE CONTATO

Medidas de ângulo de contato foram realizadas com água em um sistema de medição de ângulo de contato (WCA) com goniômetro KRUSS (DAS 100S/2014), IQ - UFRGS. Os ângulos de contato obtidos permitiram determinar a molhabilidade da superfície dos filmes de PLA, PHA e das blendas preparadas. Um menor ângulo de contato indica maior molhabilidade do material.

4.21 PROPRIEDADES FÍSICAS (TENSÃOxDEFORMAÇÃO)

A espessura do filme foi obtida com um micrômetro digital (MDC-25, Mitutoyo Corp. Tokyo, Japão) com escala de 0-25 mm e precisão de 0,001 mm, realizadas no Laboratório de Análises Físicas, ICTA – UFRGS. Foram realizadas 10 medidas de forma aleatória nos filmes e a média das medidas foi reportada como a espessura (mm). A resistência à tração e a porcentagem de alongação dos filmes foram determinadas de acordo com as normas da ASTM D882-09⁸⁷ com modificações, usando um texturômetro (TA-XT2i, Stable Micro Systems, Surrey, UK). Foram recortadas 5 tiras de cada filme com 50 x 25 mm (comprimento x largura). As tiras foram então colocadas entre as garras do equipamento com uma distância inicial de 50 mm e velocidade do probe de 0,8 mm.s⁻¹.

4.22 TOXICIDADE EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Os ensaios foram realizados no laboratório de pesquisa Gentox na unidade de Biociências da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA. A linha celular humana MRC5 (fibroblasto pulmonar normal) foi obtida no Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil). A linhagem celular foi cultivada em meio DMEM (Dulbecco/Vogt meio essencial mínimo) suplementado com soro fetal bovino a 10% (Gibco BRL, Rockville, MD, EUA), penicilina 100 U.mL⁻¹

e estreptomicina $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ em atmosfera umidificada CO_2 . O ensaio de viabilidade celular foi realizado utilizando biopolímero preparado nas concentrações de 1, 10, 100, 500 e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As amostras foram diluídas com DMEM e foram adicionadas às placas de cultura de 96 poços ($1,6 \times 10^4$ células) e incubadas por 24 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ sob 5% de CO_2 . Após a incubação, a viabilidade celular foi avaliada usando o ensaio de absorção de vermelho neutro (NRU) ⁸⁸. A suspensão de biopolímero foi removida de cada poço e as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em seguida, $150 \mu\text{L}$ de corante vermelho neutro (100 mg.mL^{-1}) dissolvido no meio isento de soro (pH 6,4) foram adicionados à cultura e incubados por 3 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. As células foram lavadas novamente com PBS e, em seguida, foram adicionados $150 \mu\text{L}$ de meio de eluição (água: etanol: acetato, 50: 49: 1, v/v/v), seguidos por 30 min de agitação suave para dissolução completa. A absorbância foi registrada a 540 nm usando um leitor de microplacas. Para obter resultados confirmatórios, a viabilidade celular das células MRC5 também foi avaliada por coloração com azul de Trypan ⁸⁹. Após os tratamentos, as células foram contadas utilizando um contador automático de células Countess (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

A viabilidade celular foi expressa como uma porcentagem dos valores de controle. O teste de hemólise foi realizado com 0,1 mL de sangue de ovelha heparinizado (Laborclin, Pinhais, Brasil), misturado com 0,1 mL de suspensões de biopolímero de PBS para atingir 1, 10, 100, 500 e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As amostras foram incubadas por 1 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, os eritrócitos foram separados por centrifugação (2000 g por 10 min) e o sobrenadante (0,1 mL) foi coletado. A quantidade de hemoglobina liberada foi determinada pela leitura da absorbância a 540 nm, utilizando um leitor de placas de microtitulação. Para determinar a absorbância da hemólise a 100%, os eritrócitos foram lisados com Triton X-100 a 0,1% (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O controle negativo foi PBS. As atividades hemolíticas foram calculadas em relação às amostras tratadas com Triton X-100 ⁹⁰. Todas as experiências de viabilidade celular foram realizadas em triplicado. Os resultados são a média de três experimentos independentes \pm erro padrão. A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism, versão 6.0 (Cherwell Scientific, Oxford, Reino Unido). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA

unidirecional, seguida do teste de Tukey. Um nível alfa de 0,05 ($p < 0,05$) foi utilizado para determinar a significância em todas as análises estatísticas.

4.23 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)

Para avaliação do tamanho de partícula os biopolímeros foram dissolvidos em água Milli-Q por 24 h a 60 °C e foram analisadas em equipamento Malvern - nano 90 S. O movimento browniano das partículas em suspensão faz com que a luz laser seja espalhada com intensidades diferentes e a análise dessas flutuações de intensidade resulta na velocidade do movimento browniano e assim, o tamanho de partícula é determinado usando a relação Stokes-Einstein. Índice de refração dos biopolímeros: 1,49 e índice de absorção 0,300 e do solvente água Milli-Q: 1,33 e viscosidade (cP) 0,8872.

4.24 ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO

Foram realizados quatro experimentos seguindo os requisitos e métodos de ensaio indicados pela Norma Brasileira ABNT NBR 15448-1-2: 2008⁹¹. Os biopolímeros foram testados na forma de filmes puros e misturas com PLA (poli ácido láctico) comercial na proporção 50:50. Os *pellets* e o PHA em pó (2 g) foram solubilizados com clorofórmio (50 mL) sob agitação constante e depositados em placas de vidro para evaporação do solvente (técnica de *casting*).

4.24.1 Teste abiótico por Intemperismo Natural

A norma ASTM D 1435-13⁹² foi utilizada para avaliar a estabilidade dos materiais plásticos quando expostos ao ar livre. A durabilidade relativa dos plásticos em uso externo pode ser muito diferente, dependendo da localização da exposição, devido a diferenças na radiação ultravioleta, umidade, temperatura e outros fatores. Os resultados dos testes de exposição em curto prazo podem fornecer uma indicação do desempenho relativo ao ar livre, mas não devem ser usados para prever o desempenho absoluto em longo prazo de um material. Os ensaios foram realizados na cidade de Porto Alegre – RS, durante 180 dias no período de

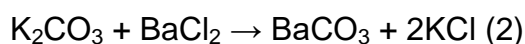
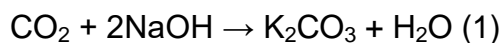
novembro/2018 a maio/2019, com as amostras em triplicata dispostas em um painel de intemperismo posicionado com inclinação de 30°, permitindo a exposição das amostras à radiação solar em toda sua superfície. As amostras foram analisadas por espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e no modo de refletância atenuada (ATR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram coletadas amostras em 45, 60, 90, 120, 150 e 190 dias. Amostras dos filmes foram cortadas no tamanho de 2 cm × 3 cm e suportada em uma tela de aço inox com abertura de 2 mm. Filmes também foram fixados em suportes de EVA (5 cm × 6 cm) com abertura de 2 cm no centro para as leituras de espectroscopia no infravermelho. Estes suportes permitiram que os filmes fossem minimamente manipulados durante as avaliações. A análise por FTIR é um método amplamente utilizado no estudo da oxidação de polímeros. A presença de grupos carbonila no polímero degradado indica que está ocorrendo oxidação. O grau de oxidação foi determinada medindo-se os picos de absorbância em relação aos grupos carbonila, permitindo quantificar a degradação oxidativa ao longo do tempo.

4.24.2 Teste de Biodegradação em Meio Aquoso (mgCO₂)

A metodologia utilizada para a biodegradação em sistema respirométrico em meio aquoso foi baseada nos parâmetros adaptados do trabalho de Larissa Stieven Montagna⁹³. Os ensaios foram realizados no laboratório de Catálise e Polímeros no Instituto de Química da UFRGS. Foi preparado meio mineral mínimo (2L) composto por: 85 mg KH₂PO₄, 218 mg K₂HPO₄, 334 mg Na₂HPO₄, 10 mg (NH₄)₂SO₄, 10 mg NH₄NO₃, 36 mg CaCl₂, 23 mg MgSO₄.7H₂O, 0,3 mg FeCl₆.6H₂O, pH 7,4 ± 0,2. O inóculo microbiano foi preparado com 30 g de solo fresco e 300 mL de água destilada. A mistura ficou sob agitação por 1 hora em temperatura ambiente e filtrada em membrana de 4 µm. Os filmes moídos e peneirados em malha de 2 mm (1 g) foram colocados em Erlenmeyer imersos em 150 mL de meio mineral e 1 mL de inóculo microbiano. Frascos plásticos tipo Falcon de 50 mL foram perfurados na metade superior para captura do CO₂ e preenchidos com 20 mL de solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,05 M e vedados com septos de borracha presos na parte superior do Erlenmeyer. Os sistemas foram preparados em duplicata para cada filme testado. Os frascos foram mantidos em agitador rotativo GFL 3005 a 120 rpm, em temperatura ambiente. A cada 7 dias foi verificada a quantidade de CO₂

liberado adicionando-se 1 mL de solução 0,25 M de cloreto de bário (BaCl₂), a cada 10 mL da solução de KOH, titulados com solução de HCl 0,11 M e indicador fenolftaleína. A cada titulação a solução de KOH (20 mL) foi substituída. A determinação da geração de CO₂ foi monitorada por 105 dias. Finalizando o experimento os resíduos de filme foram filtrados e secos a 40 °C por 48 h. Os resíduos foram pesados para análise de perda de massa, e cálculo de produção de CO₂⁹⁴.

O teor de dióxido de carbono (CO₂) produzido a partir do metabolismo microbiano foi calculado de acordo com o método descrito na ISO 17556:2012⁹⁵. Em contato com uma solução básica de hidróxido de potássio (KOH) 0,05 M, o CO₂ reage para formar K₂CO₃, que é precipitado com a solução aquosa de cloreto de bário (BaCl₂) 0,25 M formando um pó branco, correspondente a BaCO₃, de acordo com as reações (1) e (2):



Assim, a quantidade de KOH que não reage com o produto gasoso (CO₂) reage com a mesma quantidade de ácido clorídrico (HCl) 0,11 M na titulação da solução ácida, de acordo com a Equação 4⁹⁵:

$$m_{(\text{mgCO}_2)} = [(2C_S \times V_{\text{SO}}) / C_A] - [(V_A \times V_{\text{ST}}) / V_{\text{SZ}}] \times C_S \times 22 \quad (\text{Eq. 4})$$

onde, m é a massa (mg) de CO₂ liberada no teste de biodegradação, C_A é a concentração exata da solução de HCl 0,11 M, C_S é a concentração exata da solução de KOH 0,05 M, V_{SO} é o volume de KOH solução no início do teste (20 mL), V_A é o volume da solução de HCl usada para a titulação (mL), V_{ST} é o volume da solução de KOH antes da titulação (20 mL), V_{SZ} é o volume da alíquota da solução de KOH usada na titulação (10 mL), e 22 é metade do peso molecular do CO₂.

A percentagem de perda de peso foi determinada em duplicata, em função do período de incubação (número de dias) calculada usando a Equação 5⁹⁶:

$$\% \text{ Perda de massa} = [(m_{\text{inicial}} - m_{\text{final}}) / \text{massa}_{\text{inicial}}] \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

4.24.3 Teste de Biodegradação Biótico em Solo

O método determina o grau de desintegração dos materiais de teste em escala laboratorial sob condições controladas simulando um processo intensivo de compostagem aeróbica^{91,97}. Os filmes puros de PHA e blendas PHA/PLA (2 cm × 3 cm) foram pesados e acondicionados em matrizes de tela de aço inoxidável com abertura de 1 mm em solo orgânico (200 g) por 180 dias em temperatura de 58 °C em estufa adaptada. A umidade do solo simulado foi controlada por gotejamento de água sobre as bandejas realizadas diariamente. Os testes foram realizados em triplicata e os materiais compostados foram avaliados a cada 45 dias pela perda de massa, morfologia dos filmes por microscopia eletrônica de varredura e medidas do índice de carbonila e novamente compostados durante 180 dias. O grau de desintegração foi determinado após este período peneirando a matriz final através de uma peneira de 2 mm, a fim de recuperar os resíduos não desintegrados. A redução da massa da amostra é considerada como material desintegrado e usada para calcular o grau de desintegração. O solo com o material polimérico desintegrado compôs os ensaios de emergência de plântulas para avaliação de toxicidade e interferência das matrizes poliméricas no desenvolvimento de plântulas.

O índice de carbonila (IC) foi calculado pela deconvolução e razão das áreas dos picos nas regiões entre: $(1850-1650 \text{ cm}^{-1})/(1500-1420 \text{ cm}^{-1})$, observados antes e depois da exposição dos filmes ao intemperismo natural e biodegradação em solo⁹⁸.

4.24.4 Avaliação de Toxicidade no Crescimento e Germinação de Sementes

O ensaio foi adaptado a partir da norma OECD 208⁹⁹ que sugere o cultivo de três espécies no mesmo solo utilizado na biodegradação dos filmes. Foram avaliados os efeitos na emergência de plântulas e no crescimento de plantas superiores após exposição à matriz polimérica em estudo. As sementes foram colocadas em contato com o solo misturado com os biopolímeros e blendas triturados que foram avaliadas quanto aos efeitos em um período de 14 a 21 dias após o surgimento de 50% das mudas no grupo controle. Os parâmetros medidos foram: avaliação visual da emergência de plântulas, altura da parte aérea, medida da raiz e biomassa final acumulada, assim como, os efeitos visuais prejudiciais (mortalidade, anormalidades no desenvolvimento das plantas, etc.). As unidades de

teste (controles e solos tratados mais sementes) foram então colocadas em condições apropriadas para apoiar a germinação / crescimento das plantas. As medições de biomassa foram realizadas semanalmente em 7, 14 e 21 dias e comparadas às de plantas de controle. Foram selecionadas quatro espécies sugeridas pela norma, duas dicotiledôneas: Ervilha torta de flor roxa (*Pisum sativum*) e Mostarda crespa (*Brassica juncea*) da Cooperativa Agroecológica Nacional Terra e Vida Ltda., Candiota – RS, e duas monocotiledôneas: Trigo (*Triticum* spp.) Ecobio – Ind. Salet Ltda., Cel. Bicaco – RS e Rabanete (*Raphanus sativus* L.) da Cooperativa Agroecológica Nacional Terra e Vida Ltda., Candiota – RS, todas orgânicas sem tratamentos com agrotóxicos. Para que o teste seja considerado válido, os seguintes critérios de desempenho devem ser atendidos nos controles:

- a emergência de plântulas deve ser de pelo menos 80% para as culturas e 65% para as espécies não-culturas;
- o crescimento médio das plântulas de controle não exhibe efeitos fitotóxicos visíveis (por exemplo: clorose, necrose, murcha, deformação de folhas e caules);
- a sobrevivência média do controle é de pelo menos 90% durante o estudo;
- para qualquer espécie, todos os organismos testados foram da mesma fonte e todas as câmaras ou salas de teste utilizadas para cada espécie foram idênticas e tiveram as mesmas condições e a mesma quantidade de matriz do solo e meio de suporte.

4.25 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da análise de correlação apresentados neste estudo foram obtidos no software IBM-SPSS® Statistics 20. A análise foi realizada comparando todos os parâmetros de caracterização (triplicatas). Os resultados apresentaram correlações diferentes (positivas ou negativas) e foram consideradas significativas nos seguintes níveis: ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados são discutidos em quatro blocos. A primeira parte é dedicada aos resultados obtidos da caracterização das biomassas e dos meios de cultivo hidrolisados seguido da avaliação dos ensaios de crescimento dos microrganismos em cada resíduo agroindustrial. O terceiro bloco refere-se aos ensaios em meio líquido e escalonamento em biorreatores de 2 e 35 L. Finalmente, o quarto bloco refere-se a caracterização dos biopolímeros obtidos e das blendas preparadas com PLA comercial, assim como seu comportamento em ensaios de toxicidade e biodegradação.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA AGROINDUSTRIAL E MEIOS DE CULTIVO

A Tabela 1 mostra o teor de umidade e a análise elementar da biomassa agroindustrial. O teor de umidade para a massa seca de cada resíduo variou entre 5,4 e 12,2%, e essas diferenças são explicadas pelos diferentes processos de extração e características de cada resíduo em sua origem. Os teores de C, H e N nas diferentes biomassas variaram entre 40,5 - 55,4% C, 4,7 - 6,7% H e 0,1 - 3,0% N. Os maiores teores de nitrogênio foram determinados na biomassa de pele de amendoim (PE), farelo de trigo (TR), bagaço de cana (CA), casca de banana (BA) e talo de fumo (TO), resultando em uma menor relação C/N.

Tabela 1 Análise elementar de CHN da biomassa agroindustrial (%); razões atômicas C:N, H:C, O:C e teor de umidade (%)

Biomassa	Umidade	C	H	N	O	C:N	H:C	O:C
AC	8,2 ± 0,10	51,3±0,13	6,4±0,02	0,3±0,06	42,0	171	0,12	0,78
PE	6,7± 0,07	53,3±0,06	7,8±0,04	3,0±0,06	35,9	18	0,14	0,67
AR	11,9±0,15	40,5±0,13	5,7±0,03	0,1±0,01	53,7	368	0,12	1,36
BA	5,4 ± 0,05	52,9±0,38	5,5±0,04	1,4±0,01	40,2	39	0,10	0,76
CA	8,7± 0,05	49,6±0,25	4,8±0,23	1,8±0,02	43,8	28	0,10	0,91
CO	11,8±0,07	50,3±0,99	4,7±0,14	0,4±0,02	44,5	117	0,09	0,88
TO	12,2±0,29	44,3±0,46	5,8±0,02	0,8±0,01	49,1	56	0,13	1,08
TR	7,2 ± 0,09	55,4±0,50	6,7±0,12	3,0±0,03	34,8	18	0,12	0,62

AC: casca de acácia; PE: pele de amendoim; AR: casca de arroz; BA: casca de banana; CA: bagaço de cana; CO: fibra de coco; TO: talo longo de fumo e TR: farelo de trigo.

As frações de celulose, hemicelulose e lignina foram determinadas por análise termogravimétrica, conforme sugerido na literatura ¹⁰⁰ e os valores médios obtidos são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 Perfis de decomposição térmica dos respectivos componentes da biomassa lignocelulósica (%) obtidos por análise termogravimétrica (TGA)

Biomassa	Hemicelulose	Celulose	Lignina	Lipídios Proteínas	Residual	Cinzas
AC	7,47	25,56	21,59	1,82	31,29	3,64
PE	20,90	23,70	20,20	17,80	14,32	2,08
AR	5,82	20,60	25,59	2,00	39,96	12,50
BA	19,80	25,44	10,67	4,19	40,16	10,40
CA	22,30	30,16	23,30	3,72	20,58	2,35
CO	21,10	33,41	17,39	1,82	28,61	1,73
TO	12,56	20,95	21,93	2,09	32,05	9,75
TR	18,79	29,17	14,18	19,10	19,73	2,90

AC: casca de acácia; **PE:** pele de amendoim; **AR:** casca de arroz; **BA:** casca de banana; **CA:** bagaço de cana; **CO:** fibra de coco; **TO:** talo longo de fumo e **TR:** farelo de trigo.

As curvas termogravimétricas da biomassa foram divididas em regiões: de 40 - 100 °C refere-se à perda de umidade da biomassa, a região de decomposição e perda de massa de lipídios e proteínas entre: 100 - 170 °C, a região de hemiceluloses: 245 - 290 °C, a região de celulose: 290 - 350 °C e a lignina na região entre 350 - 500 °C ¹⁰¹⁻¹⁰³. As porções celulósicas e hemicelulósicas da biomassa representaram em torno de 20 e 35% e 5 e 22%, respectivamente, e estes polissacarídeos podem ser hidrolisados a açúcares e fermentados ^{104,105}. As frações de lignina variaram entre 10 e 25% na biomassa. Os termogramas são mostrados no Apêndice A (Figura A1).

Basicamente, a biomassa celulósica é composta de cadeias de celulose (polissacarídeo formado por moléculas de glicose ligadas através de ligações β -1,4-glicosídicas) unidas entre si por ligações de hidrogênio. Essas longas fibras celulósicas são, por sua vez, recobertas por hemiceluloses (polissacarídeos ramificados formados principalmente por D-xilose com pequenas quantidades de L-

arabinose, D-glicose, D-manose, D-galactose, ácido glucurônico, ácido manurônico) e ligninas (redes poliméricas tridimensionais formadas por unidades fenilpropano interligadas) ¹⁰⁶.

A maior perda de peso na região de celulose indica baixa concentração de hemicelulose como observado nos termogramas das amostras de casca de acácia (AC), casca de arroz (AR) e talo de fumo (TO), consistentes com a análise de composição e origem destas biomassas. Os percentuais de lipídios e/ou proteínas nas amostras de pele de amendoim (PE) e no farelo de trigo (TR) corroboram com as frações de nitrogênio determinadas nas análises elementares indicando a presença de lipídios e proteínas. A pele de amendoim possui como característica a presença de 0,3% de óleo em sua composição ¹⁰⁷.

As análises por espectroscopia de infravermelho (FTIR) confirmaram a identificação destes componentes e serviram também para avaliar a presença de possíveis contaminantes orgânicos nos resíduos.

Os espectros de FTIR da biomassa são caracterizados pelas bandas vibracionais do material detectadas entre 1750-1000 cm^{-1} (em PE, BA e CA), e as demais são relacionadas principalmente as bandas de celulose, hemicelulose e lignina, conforme descrito na literatura ^{108,109}. Os espectros apresentam um conjunto de bandas de absorção semelhantes. A lignina, uma macromolécula aromática, exibe absorções características das ligações (C=C) em aproximadamente 1618 e 1664 cm^{-1} , e as bandas intensas em 1234 e 1267 cm^{-1} são atribuídas aos grupos acetila da lignina. Outras bandas de absorção nos espectros são observadas a 2950 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento (C-H) dos grupos alifáticos, principalmente segmentos de celulose, hemicelulose e cera presentes na fibra; as bandas observadas em 1029 e 1053 cm^{-1} são atribuídas ao alongamento das ligações (C-O-C) presentes na celulose e na hemicelulose, na casca de arroz em 1085 cm^{-1} (deformação angular: Si-O-Si). Em 3300 cm^{-1} , os estiramentos dos grupos hidroxila (O-H) de celulose são observados, e em 1726 cm^{-1} (PE, BA e CA), o estiramento dos grupos carbonila (C=O) está relacionado à hemicelulose e lignina presentes nestas biomassas ¹¹⁰. Os espectros de FTIR e em modo de refletância atenuada (ATR) são mostrados no Apêndice A, Figuras A2 e A3. O FTIR foi usado para caracterizar a biomassa de acordo com seus grupos orgânicos e o principal resultado dos ensaios está associado à lignina. Grupos hidroxila fenólicos têm um efeito inibitório e é importante reduzir a quantidade desses grupos durante o pré-

tratamento para aplicações em cultivos biológicos ou produção de enzimas. Diferentes matérias-primas que foram pré-tratadas com diferentes concentrações de ácido indicaram diferenças importantes pela composição de lignina das matérias-primas e foram analisados por esta técnica ¹¹¹. O ATR possibilitou a observação de grupos orgânicos de cadeias laterais na superfície da pele de amendoim mostrando uma diferenciação entre as outras biomassas. A Tabela 3 mostra as regiões de absorção no espectro infravermelho e suas atribuições para as diferentes amostras de biomassa avaliadas.

Tabela 3 Principais picos de absorbância dos espectros obtidos das análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) da biomassa lignocelulósica

AC	PE	AR	BA	CA	CO	TO	TR	Atribuição
3327	3731	3309	3369	3346	3369	3354	3334	Estiramento: O-H
2927	2915 2848	2918	2931	2914	2943 2889	2947	2927	Estiramento: C-H
		2339						Estiramento: C=O
	1742		1726	1726				
1622	1639	1664	1622		1618	1620	1656	Estiramento: C=O / C=C
1521	1560	1512			1512		1535	Vibrações do anel aromático
1442	1452			1435	1435	1429	1452	C-O-H no plano
			1413				1421	
	1371			1354		1375	1371	Deformação angular: C-O-H
1321						1315		
1234	1255			1248	1267	1242	1251	Estiramento: C-C e C-O
	1157						1157	Deformação angular: C-O-C
		1085						Deformação angular: Si-O-Si
1037	1033		1037	1053	1053	1049	1029	Estiramento: C-O, C-C

AC: casca de acácia; **PE:** pele de amendoim; **AR:** casca de arroz; **BA:** casca de banana; **CA:** bagaço de cana; **CO:** fibra de coco; **TO:** talo longo de fumo e **TR:** farelo de trigo.

A presença de óleo na pele de amendoim é mostrada pelo forte sinal registrado em 2915 e 2848 cm⁻¹ característicos de estiramento assimétrico (C-H) e de deformação angular (H-C-H), respectivamente, típicos da composição de triglicerídeos. Como todas as cascas de sementes, as peles de amendoim têm um alto teor de fibras, mas devido à presença de núcleos e germes residuais, também podem ser ricos em proteínas e óleos ¹⁰⁷.

A análise textural dos resíduos foi realizada. As isotermas resultantes mostram similaridade entre as biomassas, exceto a casca de banana (área superficial mais baixa), o talo de fumo e o farelo de trigo (diâmetro de poros maiores)

⁸⁰ e são mostrados no Apêndice A, Figuras A4. A área específica (A_{BET}), o diâmetro dos poros ($D_{p_{BJH}}$) e volume dos poros (V_p) obtidos por adsorção de nitrogênio e diâmetros de partícula e sua organização são mostrados na Tabela 4. As análises de adsorção de nitrogênio indicaram baixas áreas específicas, variando entre 0,27 e 2,46 $m^2.g^{-1}$, e uma estrutura mesoporosa com diâmetros de poro entre 5,2 e 34,4 nm. O processo de hidrólise da celulose depende grandemente da adsorção do agente ao substrato. Isso é determinado pela área específica, do tamanho das partículas, porosidade e volume dos poros ¹¹². Variação na distribuição do tamanho dos poros é considerada como indicação direta das informações de acessibilidade da área de superfície e maiores diâmetros demonstram um aumento na taxa de hidrólise da celulose ¹⁰⁸.

O SAXS é usado para sondar estruturas em uma faixa de tamanho entre aproximadamente 1 nm e 100 nm, que corresponde exatamente às características da estrutura da microfibrila da celulose e foi utilizada para estudar a estrutura dos resíduos em diferentes níveis. Os resultados obtidos pela análise SAXS indicam diâmetros de partículas primárias entre 0,07 e 2,55 nm e organização no segundo nível com diâmetros entre 3,73 e 12,9 nm, apresentando uma estrutura do tipo fractal de massa ($1 < P < 2$) para todos os resíduos, exceto para resíduos de casca de arroz, talo de fumo e farelo de trigo com estrutura fractal de superfície ($2 > P < 3$) menos ramificada que os demais. No terceiro nível de organização, os resíduos de acácia, casca de banana e fibra de coco se aproximaram da estrutura fractal da superfície e o restante das amostras de biomassa se aproximou de uma estrutura aproximadamente esférica (P_4) com alguma rugosidade e valores de P entre 3,4 e 3,8 ¹¹³. Os dados obtidos foram utilizados para avaliar como os tratamentos de hidrólise afetaram a estrutura física da parede celular para determinar o método ideal de processamento ¹¹⁴. A diminuição da intensidade de espalhamento nos resíduos de casca de banana e talo de fumo pode ser explicada com o aumento de teor de amilose/amilopectina ou por uma diminuição na diferença de densidade de elétrons entre as regiões cristalina e amorfa dos resíduos. Extremidades desordenadas de hélices duplas de amilopectina e ou de hélices duplas que não participam da formação de cristais também são propostas para contribuir com maiores desordens no empacotamento da estrutura lamelar do material ¹¹⁵. Os gráficos obtidos são mostrados no Apêndice A, Figura A5.

Tabela 4 Dados obtidos por adsorção de nitrogênio (BET) e raios X a baixos ângulos baixos (SAXS) da biomassa agroindustrial

Resíduo	Adsorção de nitrogênio			SAXS			
	A_{BET} ($m^2 \cdot g^{-1}$)	Dp_{BJH} (nm)	Vp ($cm^3 \cdot g^{-1}$)	$Dp1$ (nm)	$Dp2$ (nm)	P2	P3
AC	1,19 ± 0,027	7,9	0,0012	0,82	3,73	1,49	2,91
PE	0,61 ± 0,039	3,7	0,0002	0,80	4,07	1,75	3,25
AR	1,79 ± 0,019	11,7	0,0031	0,67	4,76	2,63	3,54
BA	0,27 ± 0,039	7,9	0,0005	0,07	3,73	1,47	2,98
CA	1,84 ± 0,014	5,2	0,0022	1,53	5,83	1,82	3,79
CO	2,46 ± 0,013	7,7	0,0046	2,55	12,9	1,72	2,86
TO	1,38 ± 0,014	13,2	0,0029	0,42	4,28	2,61	3,61
TR	0,67 ± 0,011	34,5	0,0004	0,88	4,48	2,39	3,41

AC: casca de acácia; PE: pele de amendoim; AR: casca de arroz; BA: casca de banana; CA: bagaço de cana; CO: fibra de coco; TO: talo longo de fumo e TR: farelo de trigo.

Os extratos obtidos a partir da biomassa hidrolisada foram analisados em termos de teor de lignina solúvel e insolúvel, carbono total (orgânico e inorgânico) e açúcares redutores totais como mostrado na Tabela 5.

Geralmente, a hidrólise ácida mostrou-se eficiente na quebra das ligações glicosídicas da hemicelulose (maiores concentrações de açúcares redutores totais), fragmentando praticamente todo esse componente e foi menos eficiente na quebra da lignina quando comparado ao tratamento alcalino que ocasiona a fragmentação efetiva tanto da lignina (>90%), quanto da hemicelulose (>80%)¹¹⁶. Entretanto, o processo alcalino promoveu escurecimento das polpas na medida em que fragmentou a lignina, provável oxidação. Cabe salientar que os meios também apresentaram maior viscosidade e dificuldades de filtração.

A maior concentração de carbono orgânico total disponível foi obtida das hidrólises ácidas das seguintes biomassas ($g \cdot L^{-1}$): TR (9,60), CA (9,33), TO (7,14), BA (6,63) e PE (5,92). Os açúcares redutores totais (ART) foram identificados em maior quantidade nas amostras das hidrólises ácidas em ($g \cdot L^{-1}$): CA (4,33), TO (3,41) e AR (3,23), nas demais biomassas foram detectadas em média $2,53 \pm 0,12 g \cdot L^{-1}$ de açúcares redutores totais.

Tabela 5 Teores de lignina solúvel e insolúvel, frações de carbono orgânico e inorgânico e açúcares redutores totais dos meios hidrolisados

Hidrólise/Resíduo	Lignina solúvel (%)	Lignina insolúvel (%)	TOC (g.L ⁻¹)	IC (mg.L ⁻¹)	TC/NPOC (g.L ⁻¹)	ART (g.L ⁻¹)
HA_AC	5,31	28,9	4,00	0,37	4,37	2,63
HB_AC	5,67	26,6	2,45	0,41	2,85	0,45
HA_PE	5,72	20,2	5,65	0,28	5,92	2,54
HB_PE	3,06	5,9	3,16	0,24	3,39	1,98
HA_AR	3,54	30,4	3,83	0,25	4,07	3,23
HB_AR	4,75	21,7	1,21	0,23	1,47	0,19
HA_BA	0,62	5,5	6,37	0,26	6,63	2,65
HB_BA	0,73	4,6	2,00	0,25	2,25	0,80
HA_CA	2,68	13,2	9,01	0,32	9,33	4,33
HB_CA	4,56	10,2	3,96	0,34	4,30	0,19
HA_CO	5,85	23,2	3,34	0,54	3,88	2,50
HB_CO	6,53	17,4	2,74	0,35	3,09	0,60
HA_TO	6,50	16,0	6,88	0,26	7,14	3,41
HB_TO	5,28	18,7	2,19	0,27	2,46	0,20
HA_TR	3,21	6,9	9,30	0,29	9,60	2,31
HB_TR	5,07	10,1	2,74	0,54	3,28	0,28

HA: hidrólise ácida; **HB:** hidrólise alcalina; **TOC:** carbono orgânico total; **IC:** carbono inorgânico; **TC/NPOC:** carbono total/carbono orgânico não purgável; **ART:** açúcares redutores totais.

Os dados obtidos foram agrupados através de ferramentas matemáticas da IBM SPSS Statistics® para análise de agrupamento (análise de clusters). O resultado da análise de agrupamentos está representado no dendrograma mostrado na Figura 11. O dendrograma da Figura 11 mostra a casca de arroz (AR) isolada em um cluster único indicando o maior distanciamento em comparação às outras biomassas. A casca de arroz é uma fonte renovável composta de diferentes compostos orgânicos (mistura de fenóis, álcoois e ácidos orgânicos) e produtos inorgânicos, incluindo materiais contendo silício e carbono, como: SiO₂, SiC, Si, silicatos mesoporosos e outros, bem como materiais de carbono com textura micro e mesoporosa. Um amplo espectro de produtos que podem ser produzidos a partir de casca de arroz está relacionado à sua composição específica. De acordo com literatura, casca de arroz compreende celulose, hemicelulose, lignina e porção inorgânica constituída principalmente por sílica. O conteúdo total de outros elementos e compostos na casca de arroz não excede 1 a 3%. Assim, a casca de arroz pode ser considerada como um composto natural feito de matriz de biopolímeros e uma fase de reforço de sílica¹¹², o que a diferencia dos demais resíduos.

O cluster principal agrupa por similaridade as biomassas de pele de amendoim (PE) e farelo de trigo (TR), casca de banana (BA), bagaço de cana (CA) e talo de fumo (TO) que possuem relações de C:N mais baixas que favorecem o crescimento dos microrganismos. A casca de acácia (AC) e a fibra de coco (CO) formam um segundo subgrupo.

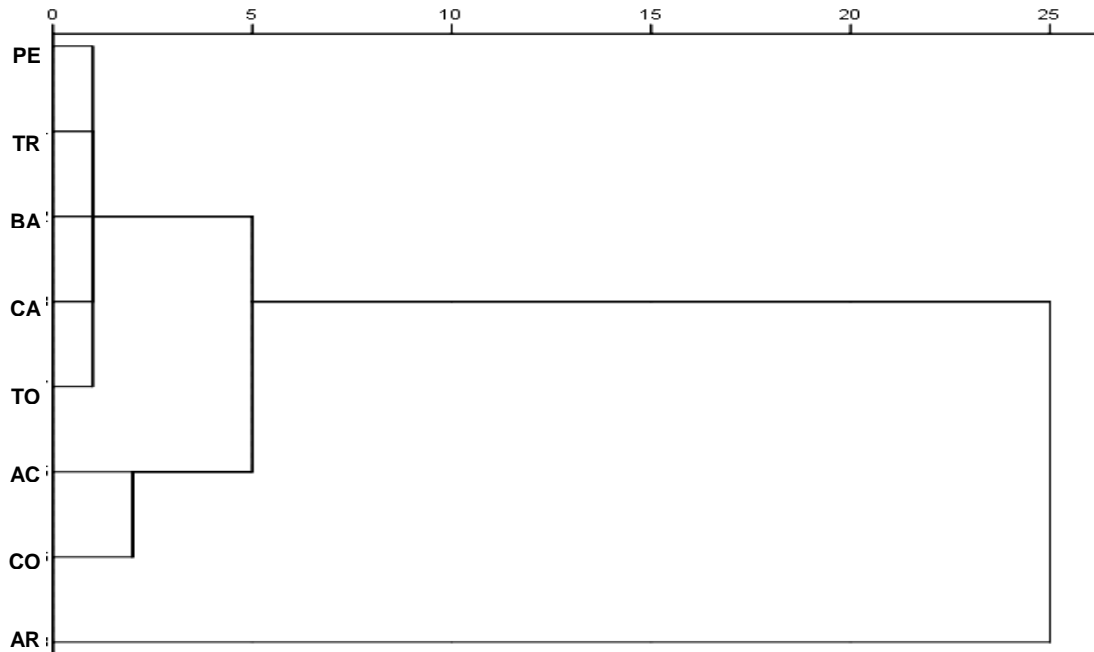


Figura 11 Dendrograma gerado das variáveis das composições elementares, texturais, lignina solúvel e insolúvel, frações de carbono e açúcares totais após hidrólise dos resíduos: AC (Casca de Acácia), PE (Pele de Amendoim), AR (Casca de Arroz), BA (Casca de Banana), CA (Bagaço de Cana), CO (Fibra de Coco), TO (Talo de Fumo) e TR (Farelo de Trigo)

A escolha do pré-tratamento deve ser feita com base na natureza física e química da biomassa visando à liberação máxima de açúcares redutores e carbono orgânico total via hidrólise. Além disso, alguns pré-tratamentos dão origem a moléculas inibidoras que foram removidas após a formação, estas estratégias foram observadas para atender às demandas para produção em maior escala e aproveitamento dos resíduos após hidrólise.

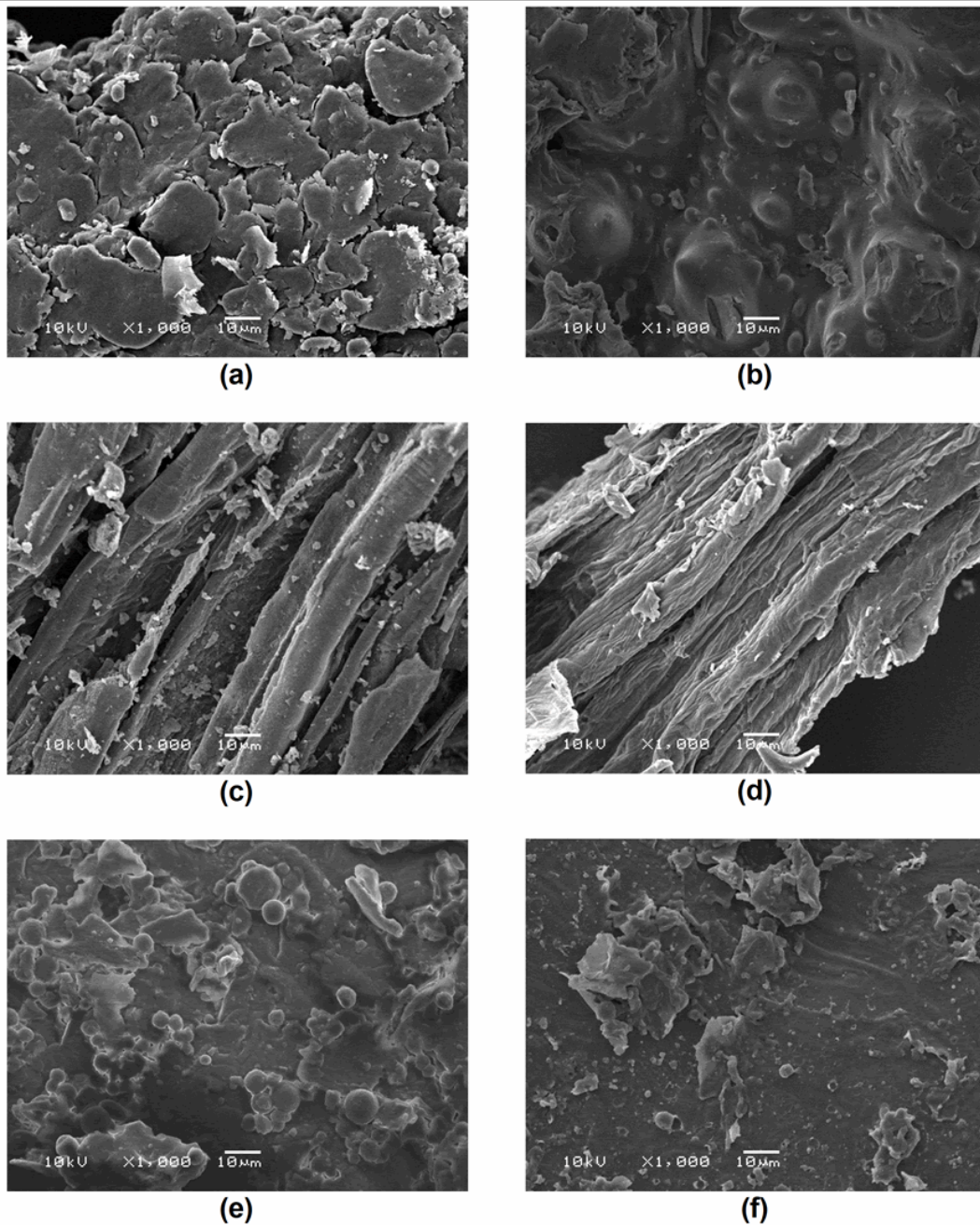


Figura 12 Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das biomassa agroindustriais puras e após hidrólise ácida: (a) Farelo de trigo, (b) Resíduo hidrolisado de farelo de trigo, (c) Talo de fumo, (d) Resíduo hidrolisado de talo de fumo, (e) Pele de amendoim e (f) Resíduo hidrolisado de pele de amendoim

A morfologia externa da biomassa foi estudada pela metodologia de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e foram complementares às análises de composição e textura e são mostradas na Figura 12. Estudos sobre a morfologia do bagaço de cana-de-açúcar submetido a um pré-tratamento combinado de hidróxido de sódio e silanos, mostraram que a superfície do bagaço bruto apresentou menor rugosidade quando comparada com o bagaço pré-tratado, causado pela remoção de

ácidos graxos da superfície do bagaço. Estudos morfológicos de coco verde, palha de soja, farelo de trigo, casca de arroz, bagaço de cana, maçã e caju também foram realizados após diferentes pré-tratamentos e revistos na literatura ^{117,118}.

5.2 CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS EM MEIO SÓLIDO

Na etapa de triagem (*screening*), os meios hidrolisados ácidos e alcalinos solidificados com Agar foram cultivados com os quatro microrganismos para avaliação de crescimento. A Tabela 6 resume os resultados do crescimento dos microrganismos nos diferentes meios e foram classificados por crescimento positivo (+) ou negativo (-) e por desenvolvimento: forte (s) ou fraco (w). A avaliação foi feita visualmente após 24 e 48 h de incubação das placas a 37 °C.

Tabela 6 Avaliação do crescimento de microrganismos nos meios sólidos obtidos dos hidrolisados ácidos e alcalinos

Biomassa	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
HA_AC	+ (w)	+ (w)	+ (w)	+ (w)
HB_AC	+ (w)	+ (w)	-	+ (w)
HA_PE	+ (s)	+ (w)	+ (s)	+ (s)
HB_PE	+ (w)	-	+ (s)	+ (s)
HA_AR	+ (w)	+ (w)	+ (w)	+ (w)
HB_AR	+ (w)	+ (w)	-	+ (w)
HA_BA	+ (s)	-	+ (s)	+ (w)
HB_BA	+ (w)	-	+ (w)	+ (w)
HA_CA	+ (s)	+ (s)	+ (s)	+ (s)
HB_CA	+ (w)	+ (w)	-	+ (w)
HA_CO	+ (w)	+ (w)	+ (w)	+ (w)
HB_CO	+ (w)	+ (w)	+ (w)	+ (w)
HA_TO	+ (w)	-	+ (s)	+ (s)
HB_TO	+ (w)	+ (w)	+ (w)	+ (s)
HA_TR	+ (s)	+ (s)	+ (s)	+ (s)
HB_TR	+ (w)	-	-	+ (w)

HA: hidrólise ácida; HB: hidrólise alcalina; (+) crescimento positivo; (s) forte; (w) fraco e (-) sem crescimento

De acordo com a Tabela 6, na avaliação do meio sólido, *B. amyloliquefaciens* e *B. licheniformis* apresentaram melhor crescimento em meios hidrolisados ácidos das biomassas: de PE, BA, TO e TR. Os microrganismos: *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* se desenvolveram em meios hidrolisados ácidos e alcalinos a partir de todas as biomassas, mais significativamente nos hidrolisados ácidos de: PE, CA, TO e TR. O microrganismo *B. cereus* cresceu apenas nos meios ácidos de CA e TR. O desenvolvimento dos microrganismos nesses meios corrobora com as

relações C:N cujos valores são considerados dentro de uma faixa ideal para o desenvolvimento dos microrganismos ¹¹⁹.

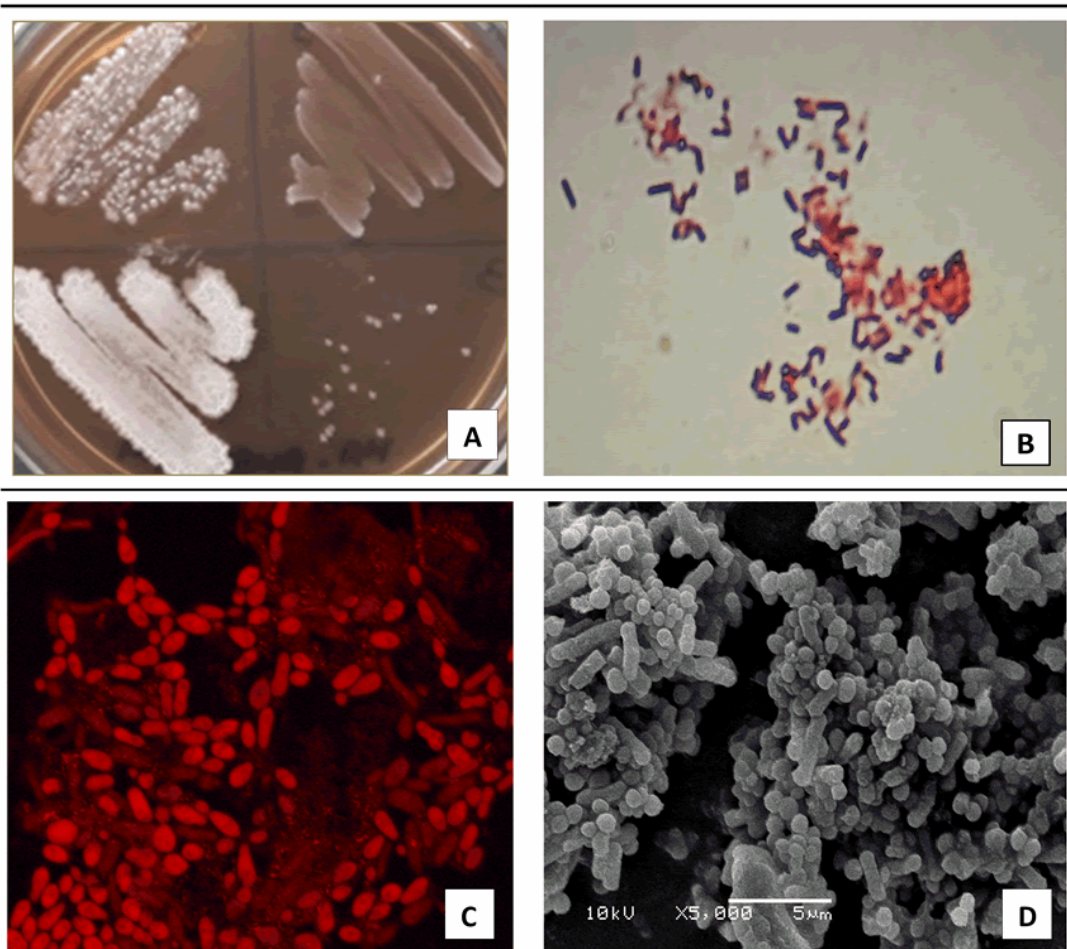


Figura 13 (A) Imagem da placa de Petri após cultura em meio de pele de amendoim hidrolisado ácido, no sentido anti-horário: *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. cereus*; **(B)** Imagem de microscopia óptica dos grânulos de PHA corados em azul em cultivo do meio hidrolisado ácido da pele de amendoim com *B. amyloliquefaciens*; **(C)** Micrografia confocal de fluorescência do polímero acumulado nas células; **(D)** Micrografia eletrônica de varredura mostrando a morfologia das células com grânulos de PHA acumulado.

Imagens de todas as placas cultivadas em meio sólido são mostradas no Apêndice B na Figura B1, onde podem ser visualizadas as diferenças dos crescimentos nos meios hidrolisados alcalinos e ácidos e em meio nutritivo MH.

Vale ressaltar que os microrganismos do gênero *Bacillus* sp. são capazes de cultivar e sintetizar todos os componentes do citoplasma em um meio simples contendo C e N como nutrientes. Em geral, dois terços dos carbonos disponíveis são usados pelos microrganismos para obter energia, e o outro terço do carbono em conjunto com o nitrogênio é usado para formar novas células microbianas. O

citoplasma microbiano tem uma relação C:N próxima a 10, mas, para sintetizar 10 carbonos, os microrganismos requerem aproximadamente 20 carbonos para obter energia suficiente. Para taxas C:N mais altas, a falta de nitrogênio pode limitar o crescimento microbiano ¹²⁰.

5.3 CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS EM MEIO LÍQUIDO

A partir dos resultados obtidos em meio sólido, os cultivos em meio líquido foram realizados somente com os meios obtidos por hidrólise ácida. A observação das fases de crescimento microbiano e adaptação dos microrganismos no meio de cultura líquida foram acompanhadas por medidas de densidade óptica (OD_{600}).

A fase de latência e/ou adaptação dos microrganismos teve duração em média entre 6 e 8 h. Assim, para os novos ensaios foi definida que a estratégia de adição de meio de reforço ocorresse após 8 h do inóculo do microrganismo. Com esta estratégia observou-se o aumento da biomassa microbiana durante a fase logarítmica de crescimento e maior acúmulo de biopolímeros. A fase estacionária ocorreu em média, após 30 h de cultivo. As causas dessa parada no crescimento podem ser devidas ao acúmulo de metabólitos tóxicos, depleção de nutrientes ou de oxigênio ¹²¹.

O pH inicial (7) foi monitorado mas não ajustado e ao final dos ensaios o pH medido se manteve na faixa entre 5 – 5,5. Foram comparados os crescimentos dos microrganismos em meio nutritivo Mueller Hinton e nos meios hidrolisados ácidos com e sem reforço de nitrogênio ($(NH_4)_2SO_4$). Devido às características dos meios de cultivo, contendo fontes de carbono e nitrogênio de rápida assimilação e relação C:N balanceada (PE, CA, TO e TR) observamos que a transição entre a fase exponencial e estacionária foi rápida e o acúmulo de biopolímeros foi favorecido pela rápida exaustão de nutrientes e pela disponibilidade de oxigênio.

Como a medida de densidade óptica é uma medida indireta não podemos determinar valores de crescimento exato, mas permitiu estabelecer a quantidade de biomassa disponível em função do tempo. A Figura 14 mostra a curva obtida do cultivo de *Bacillus licheniformis* em meio de farelo de trigo e a equação obtida para cálculo da velocidade específica máxima de crescimento.

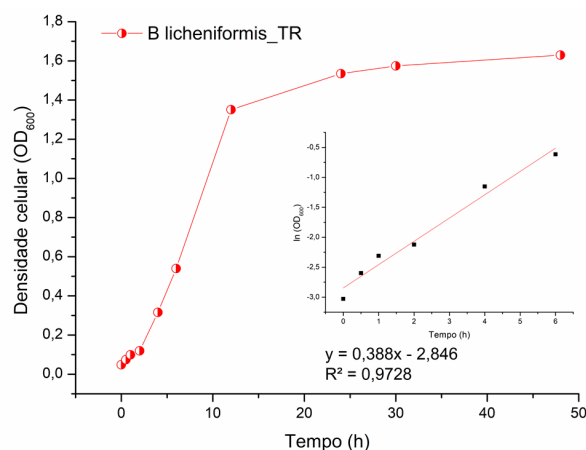


Figura 14 Relação entre densidade celular (OD600) e o tempo de cultivo de *Bacillus licheniformis* em meio de farelo de trigo (TR) hidrolisado ácido e no detalhe o cálculo de $\mu_{m\acute{a}x}$

A Tabela 7 mostra os dados obtidos dos melhores cultivos realizados em meio líquido com adição de meio de reforço enriquecido com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ após 5 h do inóculo do microrganismo mostrando: CDW (massa de células secas em g.L^{-1}), PHA extraído (%), $\mu_{m\acute{a}x}$ velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}), Equação ($\ln \text{abs} = \mu_{m\acute{a}x} \cdot t$) e fator de determinação (R^2) para correlação linear. Os valores foram obtidos dos resultados das médias obtidas em triplicata. Os valores de coeficiente de determinação (R^2) das regressões lineares foram satisfatórias nos quatro microrganismos com menor ajuste nos cultivos com o microrganismo *Bacillus cereus*. As curvas de crescimento obtidas nos diferentes meios para os quatro microrganismos são mostradas no Apêndice C.

Em geral, a produção microbiana de PHA segue uma sequência de etapas complexas do processo incluindo: crescimento da cultura, acumulação de biopolímero intracelular, separação da biomassa celular e extração dos biopolímeros que podem afetar a qualidade final do produto. Além disso, o rendimento de PHA e a qualidade do polímero (por exemplo, distribuição de massa molar) dependem de vários parâmetros (ou seja, o tipo de fonte de carbono, a cepa bacteriana e sua via metabólica, as concentrações dos vários nutrientes, a estratégia de cultivo, etc.¹²². O pré-requisito para o cálculo de uma estratégia operacional ideal é o disponibilidade de um modelo matemático que descreva a dinâmica da produção de PHA em uma cultura celular bacteriana¹²³. Na literatura, vários modelos matemáticos foram apresentados para controlar o acúmulo intracelular de PHA em diferentes bactérias^{122,124}. No presente estudo, nenhum modelo foi estabelecido.

Tabela 7 Dados obtidos das curvas de crescimento dos microrganismos em meios hidrolisados ácidos com adição de meio concentrado e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ após 5h.

<i>Bacillus subtilis</i>						
Cultivo	CDW (g.L ⁻¹)	PHA (g.L ⁻¹)	PHA (%)	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	Equação	R ²
AC	2,37	0,89	37,6	0,54	y= 0,54x – 2,84	0,93
PE	3,60	1,45	40,2	0,55	y= 0,55x – 3,70	0,97
AR	2,06	0,36	17,5	0,64	y= 0,64x – 4,58	0,95
BA	1,93	1,13	58,5	0,56	y= 0,56x – 3,05	0,97
CA	2,26	0,42	18,3	0,53	y= 0,53x – 2,63	0,94
CO	2,20	0,47	21,3	0,55	y= 0,55x – 2,88	0,92
TO	3,14	1,30	41,4	0,53	y= 0,53x – 2,55	0,94
TR	2,38	1,01	42,6	0,51	y= 0,51x – 3,44	0,97
<i>Bacillus cereus</i>						
Cultivo	CDW (g.L ⁻¹)	PHA (g.L ⁻¹)	PHA (%)	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	Equação	R ²
AC	1,53	0,85	55,3	0,57	y= 0,57x – 3,47	0,84
PE	2,04	1,76	86,3	0,55	y= 0,55x – 2,61	0,92
AR	1,43	0,45	31,2	0,67	y= 0,67x – 3,94	0,86
BA	1,64	1,29	78,6	0,62	y= 0,62x – 3,56	0,89
CA	2,03	0,59	29,2	0,62	y= 0,62x – 4,27	0,96
CO	1,05	0,34	32,0	0,65	y= 0,65x – 3,75	0,88
TO	2,13	1,29	60,6	0,62	y= 0,62x – 3,45	0,90
TR	2,29	1,02	44,8	0,55	y= 0,55x – 3,67	0,92
<i>Bacillus licheniformis</i>						
Cultivo	CDW (g.L ⁻¹)	PHA (g.L ⁻¹)	PHA (%)	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	Equação	R ²
AC	2,36	0,90	38,2	0,55	y= 0,55x – 3,47	0,80
PE	3,15	1,87	59,6	0,39	y= 0,38x – 2,89	0,97
AR	2,21	0,58	26,1	0,44	y= 0,44x – 3,86	0,90
BA	2,52	1,58	62,7	0,38	y= 0,38x – 3,13	0,97
CA	2,38	1,63	68,4	0,37	y= 0,37x – 2,93	0,98
CO	2,23	1,36	60,9	0,47	y= 0,47x – 3,38	0,87
TO	3,56	1,37	38,6	0,43	y= 0,43x – 2,95	0,96
TR	3,77	1,21	32,2	0,38	y= 0,38x – 2,84	0,97
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>						
Cultivo	CDW (g.L ⁻¹)	PHA (g.L ⁻¹)	PHA (%)	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	Equação	R ²
AC	2,94	1,06	36,0	0,45	y= 0,45x – 3,16	0,89
PE	3,93	2,21	56,1	0,41	y= 0,41x – 2,81	0,98
AR	2,76	0,56	20,3	0,45	y= 0,45x – 3,77	0,87
BA	3,15	1,86	59,0	0,37	y= 0,37x – 3,02	0,95
CA	2,98	0,74	24,9	0,38	y= 0,38x – 2,95	0,94
CO	2,78	0,42	15,0	0,56	y= 0,56x – 3,34	0,76
TO	3,01	1,62	53,8	0,39	y= 0,39x – 2,95	0,93
TR	3,78	1,58	41,8	0,37	y= 0,37x – 2,73	0,99

CDW: massa de células secas em g.L⁻¹, PHA extraído (%), $\mu_{\text{máx}}$ velocidade específica máxima de crescimento (h⁻¹), Equação: $\ln \text{abs} = \mu_{\text{máx}} \cdot t$ e fator de determinação para correlação linear R²

O microrganismo *Bacillus subtilis* acumulou em média: biomassa das células secas $2,49 \pm 0,57$ g.L⁻¹, $0,87$ g.L⁻¹ de PHA acumulado e $\mu_{\text{máx}} = 0,55 \pm 0,08$ h⁻¹. Após extração do PHA, os maiores percentuais obtidos foram dos cultivos em casca de banana (58,5%), farelo de trigo (42,6%), talo de fumo (41,4%) e pele de amendoim (40,2%).

Nos ensaios com *Bacillus cereus* observaram-se baixo acúmulo de biomassa de células secas em média: $1,77 \pm 0,42 \text{ g.L}^{-1}$ com $0,94 \text{ g.L}^{-1}$ de PHA extraído e velocidade máxima específica: $\mu_{\text{máx}} = 0,61 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$. Em cultivos em batelada utilizando somente glicose como fonte de carbono e *Bacillus cereus* foram obtidos: CDW: $3,4 \text{ g.L}^{-1}$, $1,19 \text{ g.L}^{-1}$ de PHA, correspondendo a 47,9% de scl-PHA extraído¹²⁵. Os meios de pele de amendoim (PE) e casca de banana (BA) acumularam o maior percentual de PHA extraído: 86,3 e 78,6%, respectivamente.

Bacillus licheniformis apresentou em média: $2,77 \pm 0,63 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa de células secas, média de $1,31 \text{ g.L}^{-1}$ de PHA e $\mu_{\text{máx}} = 0,43 \pm 0,06 \text{ h}^{-1}$. Os maiores acúmulos de PHA foram observados nos meios de: bagaço de cana (68,4%), casca de banana (62,7%) e pele de amendoim (59,6%).

As maiores concentrações de biomassa celular e PHA foram obtidas nos cultivos com *Bacillus amyloliquefaciens* com acúmulo médio de biomassa celular seca de: $3,17 \pm 0,44 \text{ g.L}^{-1}$, $1,26 \text{ g.L}^{-1}$ de PHA e $\mu_{\text{máx}} = 0,42 \pm 0,07 \text{ h}^{-1}$. Os melhores rendimentos foram obtidos nos meios de: casca de banana (59,0%), pele de amendoim (56,1%) e talo de fumo (53,8%). Podemos observar que as diferenças entre a velocidade máxima de crescimento entre os bacilos *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens* não foram significativas: $0,42 \pm 0,06 \text{ h}^{-1}$ e $0,41 \pm 0,07 \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

O crescimento da biomassa e o acúmulo de PHA em processos bacterianos dependem fortemente das condições nutricionais e da aeração da cultura, que influenciam diretamente nas vias metabólicas de cada microrganismo. Geralmente, as condições de crescimento desequilibradas (ou seja, excesso na fonte de carbono e limitação na fonte de nitrogênio) favorecem o acúmulo de PHA em fermentações de bactérias do tipo selvagem, enquanto o tempo em que a fonte de nitrogênio é esgotada pode ter um impacto significativo na acumulação de biopolímeros¹²².

O gráfico mostrado na Figura 15 ilustra os resultados médios obtidos nos ensaios em agitador orbital em 250 mL.

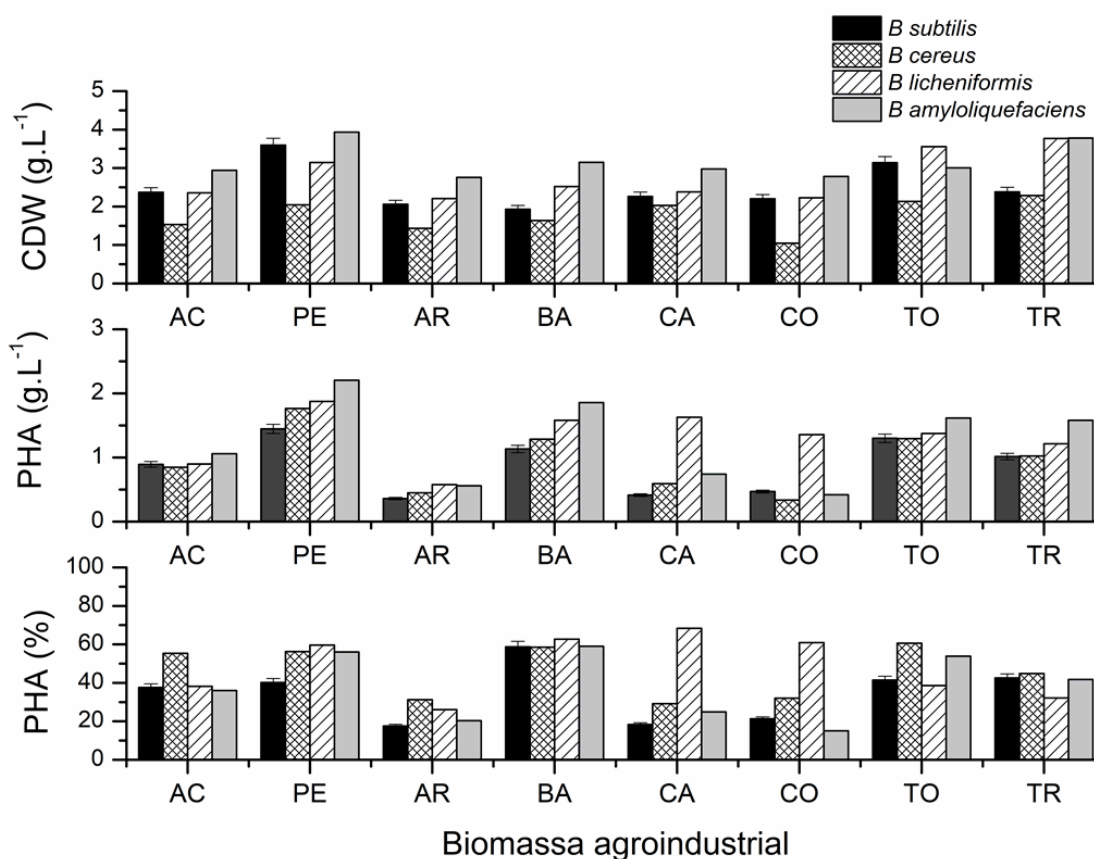


Figura 15 CDW: massa celular seca (g.L⁻¹), PHA extraído (g.L⁻¹) e % PHA extraído após 48 h de cultivo em biorreator de 250 mL

Todos os meios cultivados apresentaram alguma presença de grânulos de PHA corados no tempo de 48 h, com exceção dos cultivos de *Bacillus cereus* em meios hidrolisados ácidos de: casca de arroz (AR), casca de acácia (AC), bagaço de cana (CA) e fibra de coco (CO) que não foram visualizados.

Os resultados obtidos para o cultivo em meio líquido com *Bacillus subtilis* corroboram com os resultados nos ensaios em meio sólido que em 24 h apresentaram em sua maioria crescimento fraco, no entanto bom crescimento nos meios hidrolisados de: pele de amendoim (PE), casca de banana (BA), bagaço de cana (CA) e farelo de trigo (TR). Os melhores resultados foram obtidos com *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens* nos meios de pele de amendoim (PE), bagaço de cana (CA), fibra de coco (CO) e farelo de trigo (TR). A presença de PHA após coloração diferencial foi observada por microscopia óptica e os resultados são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 Avaliação do acúmulo de PHA por microscopia óptica após cultivo em meio líquido por 24 e 48 h e corados com corantes Sudan black e safranina

Cultivo	Tempo (h)	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
HA_AC	24h	(-)	(-)	(-)	(-)
	48h	(+)	(+)	(+)	(+)
HA_PE	24h	(+)	(-)	(+)	(+)
	48h	(+)	(+)	(+)	(+)
HA_AR	24h	(-)	(-)	(-)	(-)
	48h	(+)	(-)	(+)	(+)
HA_BA	24h	(+)	(-)	(-)	(-)
	48h	(+)	(-)	(+)	(+)
HA_CA	24h	(+)	(+)	(+)	(+)
	48h	(+)	(-)	(+)	(+)
HA_CO	24h	(-)	(+)	(+)	(+)
	48h	(+)	(-)	(+)	(+)
HA_TO	24h	(-)	(+)	(-)	(+)
	48h	(+)	(+)	(+)	(+)
HA_TR	24h	(+)	(+)	(+)	(+)
	48h	(+)	(+)	(+)	(+)

(+) presença de grânulos de PHA; (-) ausência de grânulos de PHA

Em meios nutritivos MH, o acúmulo de biomassa foi similar para os quatro microrganismos entre 3 e 4 g.L⁻¹ e a presença de PHA foi discreta. A análise inicial por GPC mostrou que os biopolímeros tinham uma massa molar média (Mn) entre 910 - 7906 Da com um índice de polidispersividade (IPD) ou distribuição de massa molar entre: 1,8 e 2,7, correspondendo a oligômeros de PHA de cadeia curta (scl-PHA). Estudos anteriores relataram que a estrutura da PHA está diretamente relacionada à composição do substrato utilizado ¹²⁶. As baixas massas molares também podem ocorrer por perdas durante a etapa de extração com hipoclorito de sódio e precipitação com acetona ²³.

Aljuraifani e colaboradores, utilizaram diferentes estratégias para obter a máxima produção de PHA em cultivos com *Pseudomonas* sp. Eles modificaram a concentração de inóculo, período de incubação e as fontes de carbono e nitrogênio. A produção de PHA aumentou de 10 para 84% com um aumento no período de incubação de 12 para 36 h. Quando o meio de produção de PHA foi suplementado com diferentes fontes de carbono, como glicose e maltose, e a produção máxima de PHA (80 a 85%) foi obtida e a produção de PHA (36 a 79%) quando o sulfato de amônio foi utilizado ¹²⁷.

Assim, com a identificação de PHA com baixas massas molares, a concentração dos meios hidrolisados foram preparados com 100 g.L^{-1} de biomassa agroindustrial para os cultivos em biorreator de 2 L mantendo as demais condições anteriores. Os microrganismos selecionados foram: *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens* com adição de meio hidrolisado concentrado e 2 g.L^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ após 8 h do inóculo microbiano inicial. Estes dois microrganismos foram eleitos para os ensaios em biorreator de 2 L porque apesar dos maiores tempos na fase de adaptação (Fase Lag) entre 7 e 8 h, apresentaram maior produção de biomassa celular e acúmulo de biopolímeros em intervalos de tempo mais curtos, quando comparados com *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*. A extração do PHA nesta etapa foi realizada com carbonato de polipropileno. Os resultados são mostrados no gráfico da Figura 16.

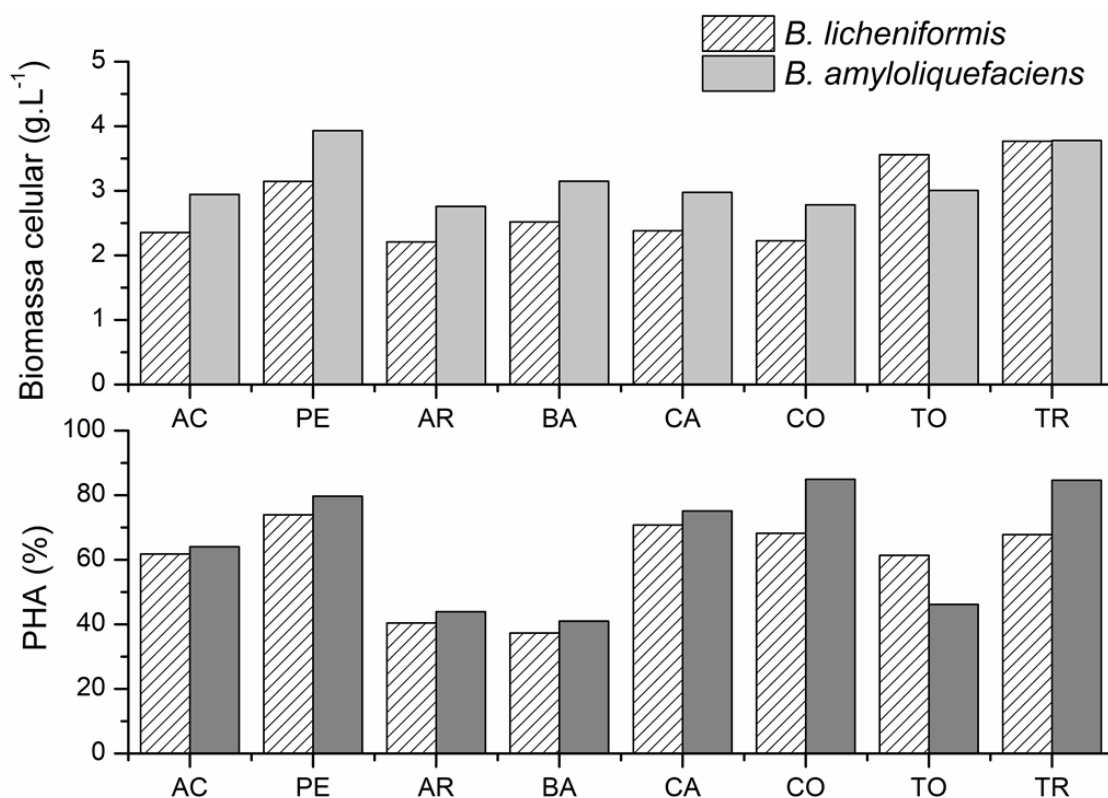


Figura 16 Biomassa celular seca (g.L^{-1}) e % PHA extraído após 48 h de cultivo em biorreator de 2 L

Em comparação com os rendimentos nos ensaios em 250 mL, os melhores resultados em biorreator de 2 L foram obtidos nos cultivos de pele de amendoim, bagaço de cana e farelo de trigo, com acúmulo significativo de biomassa celular e percentual de PHA extraído para os dois microrganismos: *B. licheniformis*: [PE]: PHA

(g.L⁻¹) = 2,7; PHA (%) = 74,6. [CA]: PHA (g.L⁻¹) = 2,3; PHA (%) = 83,4. [TR]: PHA (g.L⁻¹) = 3,3; PHA (%) = 77,1 e *B. amyloliquefaciens*: [PE]: PHA (g.L⁻¹) = 3,2; PHA (%) = 71,0; [CA]: PHA (g.L⁻¹) = 2,4; PHA (%) = 69,3. [TR]: PHA (g.L⁻¹) = 3,3; PHA (%) = 76,8. Os meios hidrolisados de casca de banana apresentaram rendimentos similares nos dois volumes testados e fibra de coco em cultivo com *B. licheniformis* apresentou redução em torno de 25% de acúmulo do PHA e somente 6% de aumento no cultivo com *B. amyloliquefaciens*. Os cultivos com meio hidrolisado de talo de fumo variaram em média 15% de PHA extraídos sendo maiores nos cultivos com *Bacillus licheniformis* e menores com *Bacillus amyloliquefaciens*.

Algumas cepas de *Bacillus* são reportadas na literatura como excelentes acumuladoras de PHA em condições de privação de nutrientes com acúmulo de biomassa celular seca entre 6 e 97%^{128,129}. Geralmente, as bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus* acumulam polihidroxialcanoatos de cadeia curta. Um recente estudo que teve como foco a propriedade de acúmulo de PHA em diferentes espécies isoladas do ambiente. Entre 24 microrganismos selecionados, o isolado mais produtivo identificado como *Bacillus aryabhatai* alcançou a produção máxima de PHA: 3,26 g.L⁻¹, 2,18 g.L⁻¹, 1,47 g.L⁻¹, 1,74 g.L⁻¹ e 1,78 g.L⁻¹ em glicose, frutose, maltose, amido e glicerol, respectivamente e foi considerado um candidato potencial para a produção em larga escala de PHA bacteriano¹³⁰.

Várias espécies produzem PHA a partir de diferentes substratos de baixo custo ou matérias-primas brutas, validando a capacidade das espécies de *Bacillus* de utilizar diversos substratos complexos e sua dependência do tipo de o substrato e enzima envolvidos no processo de fermentação¹³¹.

Com estas informações, os meios PE, CA e TR foram então combinadas e cultivadas nas seguintes proporções: TR+PE (50/50) com reforço de PE (50% (v/v)); CA+TR (50/50) com reforço de TR (50% (v/v)) e PE+CA+TR (30/35/35) com reforço de TR (50% (v/v)).

5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS

Os principais resultados obtidos dos ensaios em biorreator de 2 L são mostrados na Tabela 9 incluindo análises de GPC.

Tabela 9 Rendimentos de biomassa celular seca (CDW) e PHA (g.L⁻¹), relação (g_{PHA}/g_{substrato}), Mw (massa molar média), Mn (massa molar numérica média) e polidispersividade (Mw/Mn) obtidos em biorreator de 2 L

<i>B. licheniformis</i>							
Cultivo	CDW (g.L ⁻¹)	PHA (g.L ⁻¹)	PHA (%)	Rend. (g _{PHA} /g _s)	Mn (Da)	Mw (Da)	Mw/Mn
HA_PE	3,62	2,70	74,6	0,03	7290	14410	1,97
HA_CA	2,74	2,28	83,4	0,02	6510	8560	1,31
HA_TR	4,33	3,34	77,1	0,03	8300	15410	1,85
HA_TR+PE	4,37	3,34	76,6	0,03	100609	198754	1,97
HA_CA+TR	3,88	3,14	81,1	0,03	112608	190366	1,69
HA_PE+CA+TR	3,72	2,90	78,0	0,03	59865	105870	1,77

<i>B. amyloliquefaciens</i>							
Cultivo	CDW (g.L ⁻¹)	PHA (g.L ⁻¹)	PHA (%)	Rend. (g _{PHA} /g _s)	Mn (Da)	Mw (Da)	Mw/Mn
HA_PE	4,52	3,21	71,0	0,03	7820	9820	1,25
HA_CA	3,42	2,37	69,3	0,02	6800	7570	1,12
HA_TR	4,35	3,34	76,8	0,03	7240	8700	1,20
HA_TR+PE	4,83	3,60	74,6	0,03	100051	200433	2,00
HA_CA+TR	4,27	3,08	72,3	0,03	133181	208724	1,57
HA_PE+CA+TR	4,09	2,95	72,1	0,03	57287	101253	1,77

A Tabela 9 mostra que as maiores massas molares médias (Mn) que foram obtidas dos cultivos individuais e combinados dos meios hidrolisados de farelo de trigo e pele de amendoim ($1,1 \times 10^5$ e $1,3 \times 10^5$ Da) com índice de polidispersividade (Mw/Mn) entre 1,2 e 2,0. Estes valores são comparáveis aos biopolímeros comerciais de P(3HB) (Sigma Aldrich®: Mn $1,1 \times 10^5$ Da, Mw = $2,5 \times 10^5$ Da e Mw/Mn = 2,27), mas sugerem ser mais uniformes com menores valores de Mw/Mn. Para elucidar as estruturas dos PHAs obtidos em biorreator de 2 L foram utilizadas diferentes técnicas analíticas complementares. Os resultados sugerem diferentes estruturas: P(3HB) dos cultivos com uma única fonte de carbono, P(3HP) com meio de pele de amendoim e dois copolímeros: do cultivo com pele de amendoim e farelo de trigo: P(3HBcoHP) e, de bagaço de cana e farelo de trigo: P(3HBcoHV).

5.4.1 PHA 1: Poli-3-hidroxibutirato P(3HB)

Os biopolímeros foram analisados por espectroscopia molecular no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e em modo de refletância atenuada (ATR) (convertido em absorbância na Figura 17 (b)). O espectro de FTIR

na Figura 17 (a) revela os principais picos associados aos grupos funcionais presentes em estruturas dos PHAs obtidos dos cultivos com bagaço de cana. As principais bandas foram observadas no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} . Os sinais nas regiões: 3000-2950 cm^{-1} e 2916-2850 cm^{-1} correspondam a estiramentos assimétricos ou simétricos de grupos $-\text{CH}_3$ ($\nu_{\text{C-H}}$) e de estiramentos assimétricos de grupos $-\text{CH}_2$ ($\nu_{\text{C-H}}$), respectivamente. Em 1740 e 1658 cm^{-1} observam-se dois picos característicos de estiramento do grupo carbonila de éster ($\nu_{\text{C=O}}$) e picos entre 1232 e 1068 cm^{-1} representam estiramentos de éster ($\nu_{(\text{C-O})-\text{C}}$)¹³². A presença de estiramentos assimétricos de grupos metila tem sido recentemente reportada próxima da região de 3000 cm^{-1} indicando uma possível interação de $[\text{C-H-O}]$.

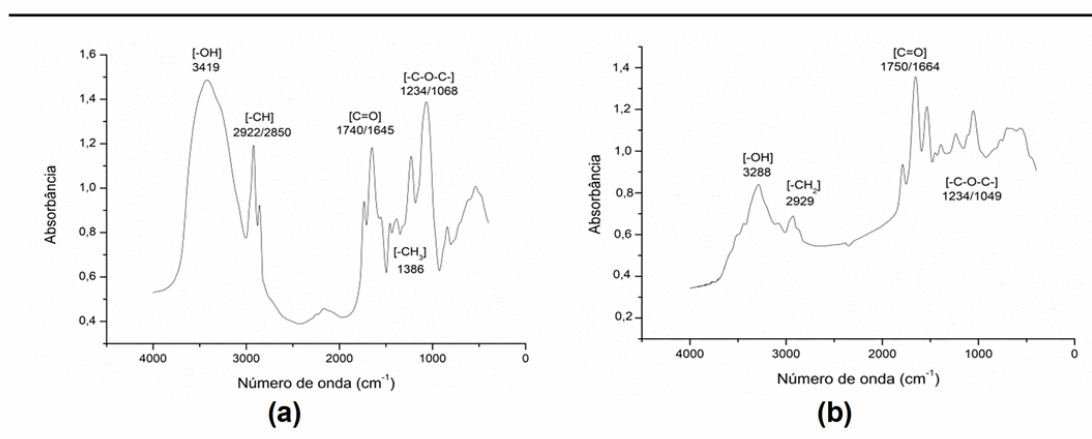


Figura 17 Espectros de infravermelho (a) FTIR e (b) ATR do PHA obtido do cultivo com *Bacillus amyloliquefaciens* em meio HA_CA

No espectro em refletância atenuada, Figura 17 (b), observa-se um pico em 3288 cm^{-1} característico de grupos hidroxila ($\nu_{\text{O-H}}$) e em 2929 cm^{-1} de estiramentos assimétricos de grupos $-\text{CH}_2$ ($\nu_{\text{C-H}}$). Em 1750 e 1664 cm^{-1} o pico correspondente ao estiramento do grupo carbonila ($\nu_{\text{C=O}}$) e a banda entre 1234 e 1049 cm^{-1} dos estiramentos de éster ($\nu_{\text{C-O-C}}$) podem ser observados¹²⁷. Assim, os espectros de infravermelho sugerem a estrutura do P(3HB), poli-3-hidroxibutirato, como principal PHA obtido nos meios de cultivo simples com apenas um tipo de biomassa. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C são mostrados na Figura 18.

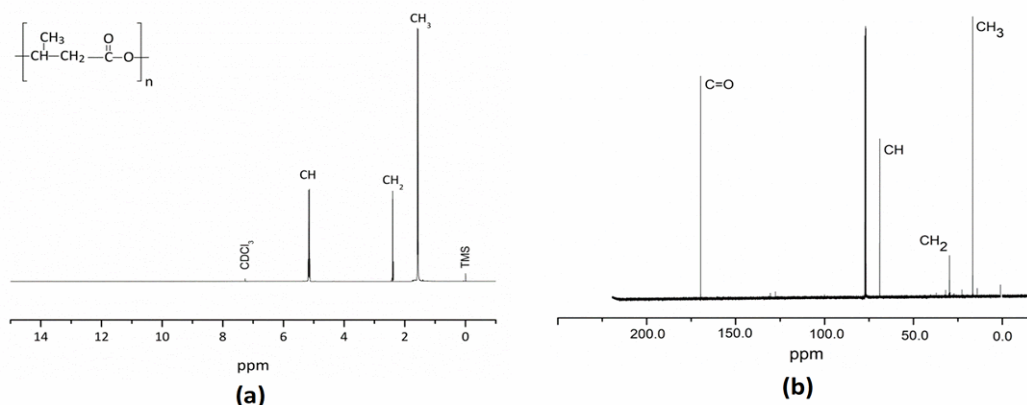


Figura 18 (a) Espectro RMN ¹H e (b) Espectro RMN ¹³C do PHA obtido em meio de cultivo HA_CA com *B. amyloliquefaciens*

Na Figura 18 (a), o espectro de RMN ¹H mostra deslocamentos químicos (δ) de PHA em 5,1 (CH), 1,6 (CH₃), 2,4 (CH₂) ppm, que indicam uma correspondência com a estrutura de P(3HB). Os sinais obtidos no espectro de RMN ¹³C corroboram essas informações e são mostrados na Figura 18 (b) com quatro tipos de carbono identificados nos deslocamentos químicos: 169,6 (C=O), 69,0 (CH), 29,8 (CH₂) e 16,5 (CH₃) ppm e obtidos em meio de cultivo HA_CA com *B. amyloliquefaciens*^{131,133}. A análise GPC mostrou que os biopolímeros tinham um massa molar média (Mn) entre 6510 e 8300 Da com um índice de polidispersividade (Mw/Mn) entre 1,12 e 1,85 correspondendo aos oligômeros de P(3HB). A Figura 19 mostra o detalhe do espectro de MALDI TOF MS no modo refletor positivo dos oligômeros inferiores com uma faixa de m/z de 900 a 4500. O espectro é dominado por uma série de picos de íons que correspondem a espécies de oligômeros intactos na região ampliada do espectro entre m/z - 1000-1800. No geral, o espectro mostra uma alta abundância de oligômeros de baixa massa molar, e a abundância diminui gradualmente à medida que a massa molar aumenta.

O espectro MALDI TOF MS mostra o pico do fragmento (m/z = 86,04) correspondente à repetição de PHA [-OCHCH₃CH₂CO-]⁺Na⁺ de poli-3-hidroxi-butirato P(3HB)¹³⁴. Os picos de fragmentos emitidos podem ser descritos como sendo compostos por um número variável de unidades (n = 86,04 Da). O pico encontrado em m / z = 1055,48 pode ser atribuído como um fragmento indicado como [P (3HB) + Na⁺] e m / z = 12 x 86,04 + 23 = 1055,48.

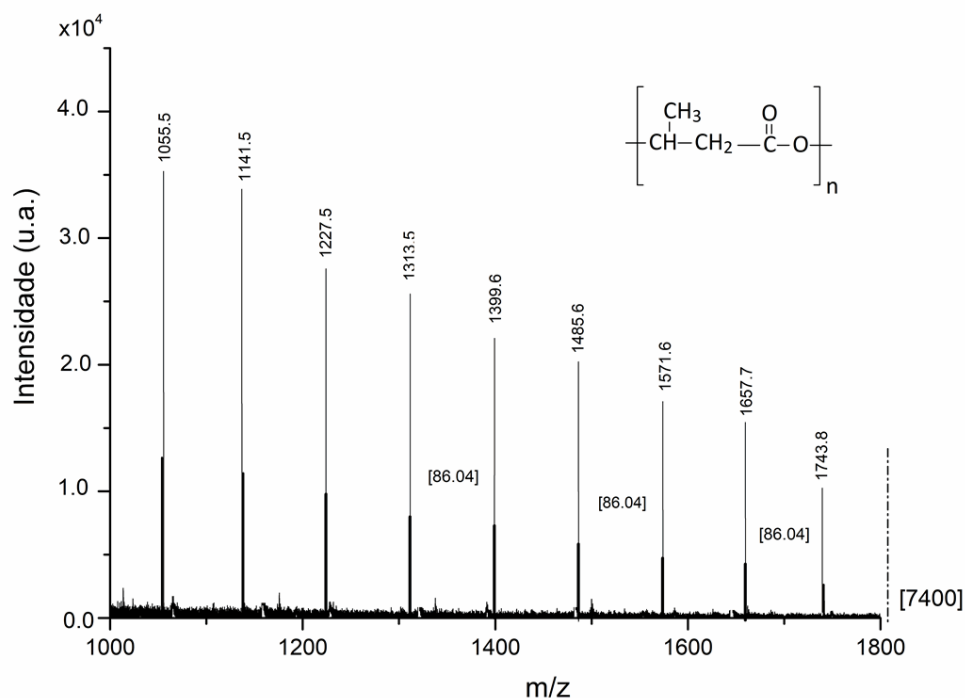


Figura 19 Espectro MALDI TOF MS dos oligômeros de PHA em modo refletor positivo no fragmento entre $m/z = 1000-1750$, no detalhe a estrutura sugerida de P(3HB).

As curvas de DSC e TG são mostradas na Figura 20 (a) e (b), respectivamente. Na curva de DSC do biopolímero foram identificados dois picos em 158,7 e 173,1 °C referentes às temperaturas de fusão (T_{m1} e T_{m2}). No entanto, esses dados foram determinados na varredura de temperatura do primeiro aquecimento.

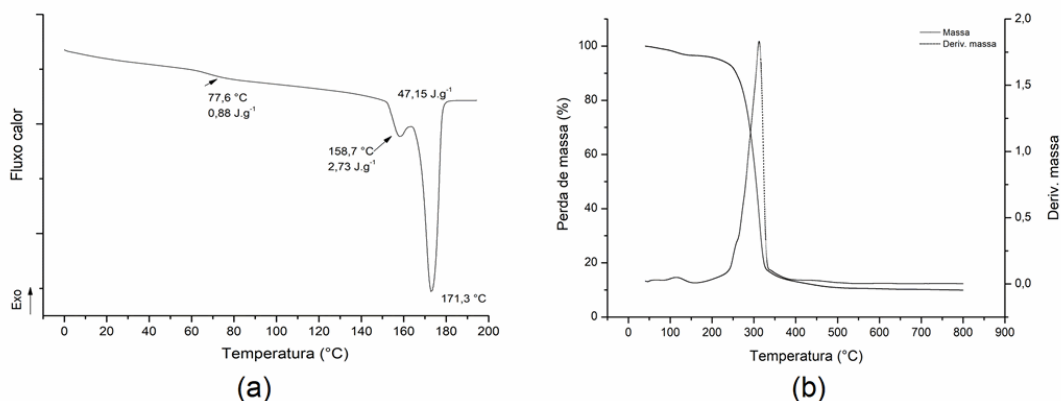


Figura 20 Curvas de DSC (a) e TGA (b) obtidos do PHA em meio de cultivo de farelo de trigo com *B. amyloliquefaciens*

A temperatura de transição vítrea (T_g) não foi detectada após o segundo aquecimento, uma vez que as amostras não apresentaram estabilidade térmica acima de 200 °C. Estas temperaturas se encontram dentro da faixa esperada em

comparação com padrões comerciais de P(3HB) onde a temperatura de fusão é de 170-180 °C.

A presença de pico de fusão duplo apresentado na curva de aquecimento já foi relatado na literatura¹³⁵ e a maioria dos perfis de fusão bimodal se deve a fenômenos simultâneos de fusão e recristalização, seguidos de fusão final em temperaturas mais altas. Segundo eles, esse processo é consequência da distribuição do tamanho dos cristais, e a temperatura de fusão é diretamente proporcional ao tamanho de cristais. O aparecimento de um pequeno ombro antes do pico máximo em filmes de PHB foi atribuído também como resultado de alterações pela baixa massa molar¹³⁶. A curva DSC mostra que o calor de fusão, determinado pela área do pico, foi de 47,15 J.g⁻¹. Considerando-se que o calor de fusão do P(3HB) puro comercial é 146 J.g⁻¹, foi possível calcular o percentual de cristalinidade do biopolímero obtido pela relação: $\Delta H_m \text{ medida} / \Delta H_m_{100\% \text{ cristalino}}$ resultando em 32,3% de cristalinidade.

Na análise por termogravimetria, as amostras mostraram-se termicamente estáveis em uma faixa de temperatura de 30 a 150 °C (Figura 20 (b)) e mostraram degradação total em um único estágio entre 250 e 300 °C, onde a degradação térmica inicial dos biopolímeros ocorreu a 225 °C e a degradação máxima a 298 °C, enquanto o padrão PHB (Sigma Aldrich®) mostra as respectivas degradações a 212 e 266 °C¹³⁷. Os resultados apresentados foram similares para todos os biopolímeros obtidos a partir dos cultivos simples para os dois microrganismos, com exceção do cultivo com pele de amendoim.

5.4.2 PHA 2: Poli-3-hidroxipropionato P(3HP)

Análises do PHA obtido a partir dos cultivos com pele de amendoim apresentaram diferenças em relação às outras biomassas. Nos espectros de infravermelho, as bandas e sinais característicos de éster também foram identificados, como mostrados na Figura 21 (a) FTIR e (b) ATR (convertido em modo de absorbância).

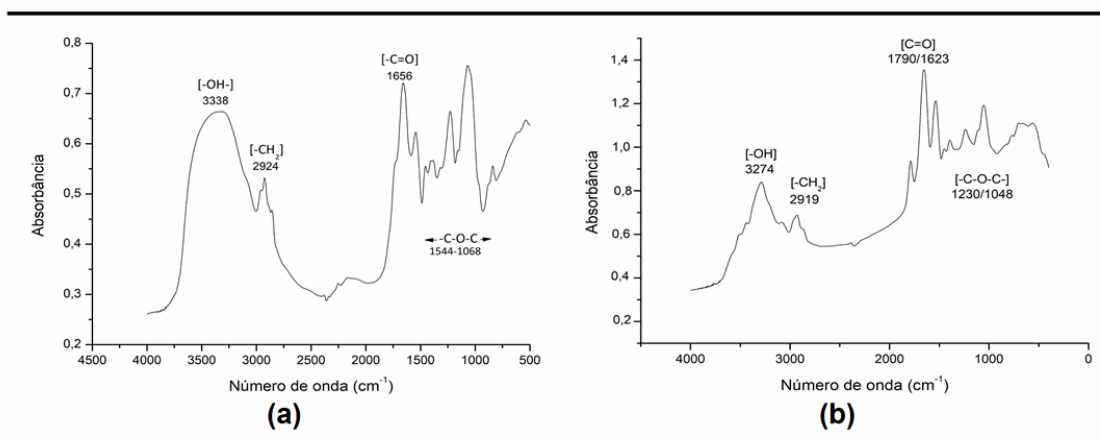


Figura 21 Espectros de infravermelho (a) FTIR e (b) ATR do PHA obtido do cultivo com *Bacillus amyloliquefaciens* em meio hidrolisado ácido de pele de amendoim

O espectro de FTIR na Figura 21 (a) revela os principais picos associados aos grupos funcionais presentes em estruturas do PHA obtido dos cultivos com pele de amendoim. As principais bandas foram observadas no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} . Os sinais nas regiões: 3338 cm^{-1} e 2924 cm^{-1} correspondem a estiramentos assimétricos e simétricos de grupos hidroxila ($\nu_{\text{O-H}}$) e de estiramentos simétricos ou assimétricos de grupos $-\text{CH}_2$ ($\nu_{\text{C-H}}$), respectivamente. Em 1656 cm^{-1} observa-se pico característico de estiramento do grupo carbonila de éster ($\nu_{\text{C=O}}$) e picos entre 1544 e 1068 cm^{-1} representam estiramentos de éster ($\nu_{\text{C-O-C}}$)¹³². No espectro em modo de refletância atenuada, Figura 21 (b), observou-se um pico em 3274 cm^{-1} característico de grupos hidroxila ($\nu_{\text{O-H}}$) e em 2919 cm^{-1} de estiramentos simétricos ou assimétricos de grupos $-\text{CH}_2$ ($\nu_{\text{C-H}}$). Em 1790 e 1623 cm^{-1} o pico correspondente ao estiramento do grupo carbonila ($\nu_{\text{C=O}}$) e a banda entre 1230 e 1048 cm^{-1} dos estiramentos de éster ($\nu_{\text{C-O-C}}$) podem ser observados¹²⁷. Não foram observados picos característicos entre 1000 e 700 cm^{-1} que pudessem sugerir a presença de estiramentos ($\nu_{\text{C-H}}$) de grupos $-\text{CH}_2$ geralmente presentes em estruturas de poli-4-hidroxitirato P(4HB).

A estrutura do PHA foi analisada e identificada pelos deslocamentos encontrados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , mostrados na Figura 22.

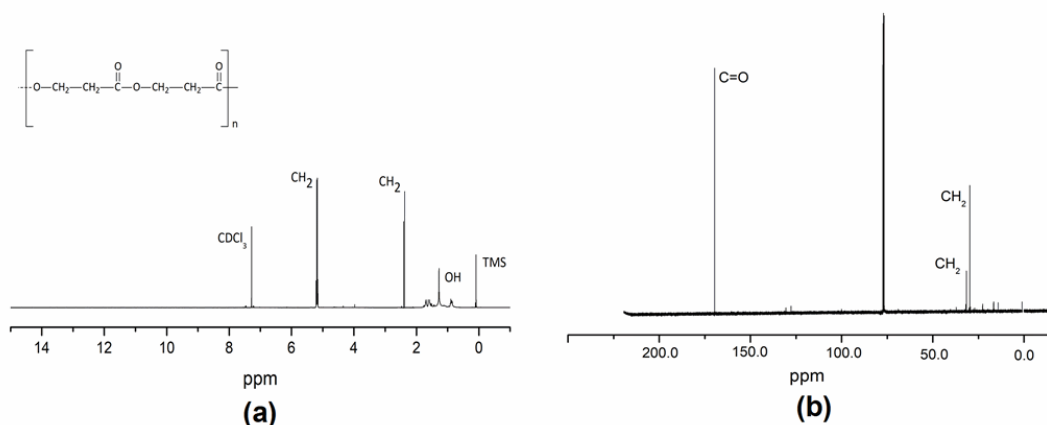


Figura 22 (a) Espectro RMN ¹H e (b) Espectro RMN ¹³C do PHA obtido em meio de cultivo HA_PE com *B. amyloliquefaciens*

Na Figura 22 (a), o espectro de RMN ¹H mostra deslocamentos químicos (δ) do PHA em 5,1 (CH) e 1,6 ppm (CH₃), que indicam uma correspondência com a estrutura de P(3HP). Os sinais obtidos no espectro de RMN ¹³C corroboram essas informações e são mostrados na Figura 22 (b) com os três tipos de carbono identificados nos deslocamentos químicos: 169,2 (C=O), 68,6 (CH) e 16,3 (CH₃) ppm do PHA obtido em meio de cultivo com pele de amendoim com *B. amyloliquefaciens*^{131,133}. A análise por GPC mostrou que os biopolímeros tinham uma massa molar média (Mn) de 7290 Da com um índice de polidispersividade (Mw/Mn) de 1,97 nos cultivos de pele de amendoim com *B. licheniformis* e, massa molar média (Mn) de 7820 Da com um índice de polidispersividade (Mw/Mn) de 1,25 nos cultivos com *B. amyloliquefaciens*, correspondendo aos oligômeros de P(3HP).

O espectro MALDI TOF MS na Figura 23 mostra os picos do fragmento (m/z 72,06 Da) correspondente à repetição: $[-OCH_3CHCO]+H_2ONa^+$ de monômeros de poli-3-hidroxi propionato P(3HP)¹³⁴. São observadas várias séries de pico espaçadas por 72,06 Da correspondente à unidade de repetição esperada. Hidroxiésteres podem ser identificados por seus íons M-H⁺ e M-Na⁺ e por um íon fragmento devido à perda de água (MH⁺-H₂O)¹³⁸. Os picos de fragmentos emitidos podem ser descritos como sendo compostos por um número variável de unidades (n = 72,06 Da). O pico encontrado em m/z = 1626,3 pode ser atribuído como um fragmento indicado como $[P(3HP) + H_2ONa^+]$ e m/z = 22 x 72,06 + 41,005 = 1626,3 Da.

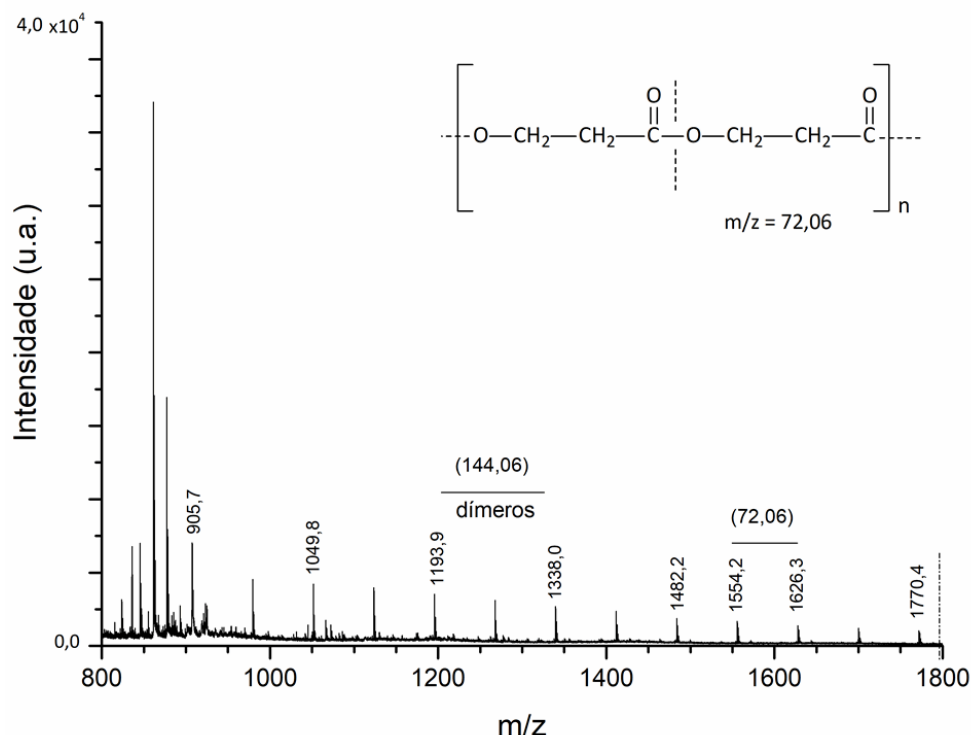


Figura 23 Espectro MALDI TOF MS dos oligômeros de PHA em modo refletor positivo no fragmento entre $m/z = 800-1750$. No detalhe, a estrutura sugerida de P(3HP)

Análises térmicas de DSC e TGA são mostradas na Figura 24 (a) e (b), respectivamente. O termograma de DSC do P(3HP) é mostrado na Figura 24 (a), a partir da qual foi identificado um pico largo centrado em $111,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ referente à temperatura de fusão (T_{m1}) e entalpia de fusão de $13,73\text{ J.g}^{-1}$. A temperatura de transição vítrea (T_g) não foi detectada após o segundo aquecimento, uma vez que as amostras não apresentaram estabilidade térmica no segundo aquecimento. Estas temperaturas são consideradas muito baixas em comparação com padrões comerciais de P(3HB) onde a temperatura de fusão é de $170-180\text{ }^{\circ}\text{C}$. Biopolímeros do tipo P(3HP) foram sintetizados anteriormente para formar copolímeros com P(3HB). O P(3HP) mostrou uma temperatura de fusão (T_m) significativamente mais baixa de $78\text{ }^{\circ}\text{C}$ em comparação ao P(3HB) ¹³⁹.

O P(3HP) microbiano tinha uma temperatura de transição vítrea (T_g) de cerca de $-21,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e uma entalpia de fusão (ΔH_m) em torno de 54 J.g^{-1} . Estes materiais apresentaram maior ductibilidade e baixa cristalinidade com o aumento da concentração do monômero de P(3HP) ¹⁴⁰.

Na análise por TGA, as amostras mostraram-se termicamente estáveis em uma faixa de temperatura de 30 a 150 °C (Figura 24 (b)) e mostraram degradação total em um único estágio entre 225 e 300 °C.

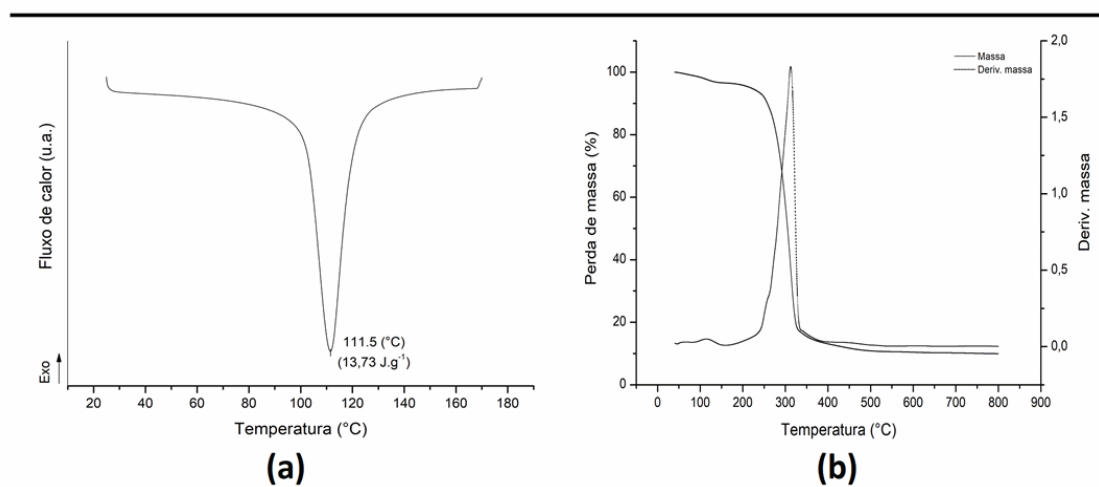


Figura 24 Curvas de DSC (a) e TG (b) obtidos do P(3HP) em meio de cultivo de pele de amendoim com *B. amyloliquefaciens*

Em revisão recente, Tsuge e colaboradores destacaram as vantagens da produção de PHA por *Bacillus* que são classificados no grupo de microrganismos que possuem sintases de Classe IV capazes de sintetizar diferentes monômeros de PHA de várias fontes de carbono, produzir copolímeros a partir de uma única fonte de carbono e produzirem PHA livres de endotoxinas. As vias da biossíntese de PHA por *Bacillus* ainda precisam ser exploradas. Os grupos funcionais nas extremidades do biopolímero são valiosos como locais reativos para o delineamento de novos materiais estruturados. A funcionalização do terminal da cadeia do PHA pode ser obtida por reação de alcoólise e o PHA pode ser aplicado para a síntese de copolímeros em bloco e controlado por sequência e estrutura, concluindo assim que as sintases da classe IV são enzimas promissoras para síntese de PHA ³⁸.

Os estudos relacionados à biossíntese de PHA por *Bacillus* podem esclarecer as diferentes estruturas obtidas neste trabalho. As principais rotas metabólicas e estruturas possíveis neste estudo são mostradas na Figura 25 e detalhadas no Anexo II.

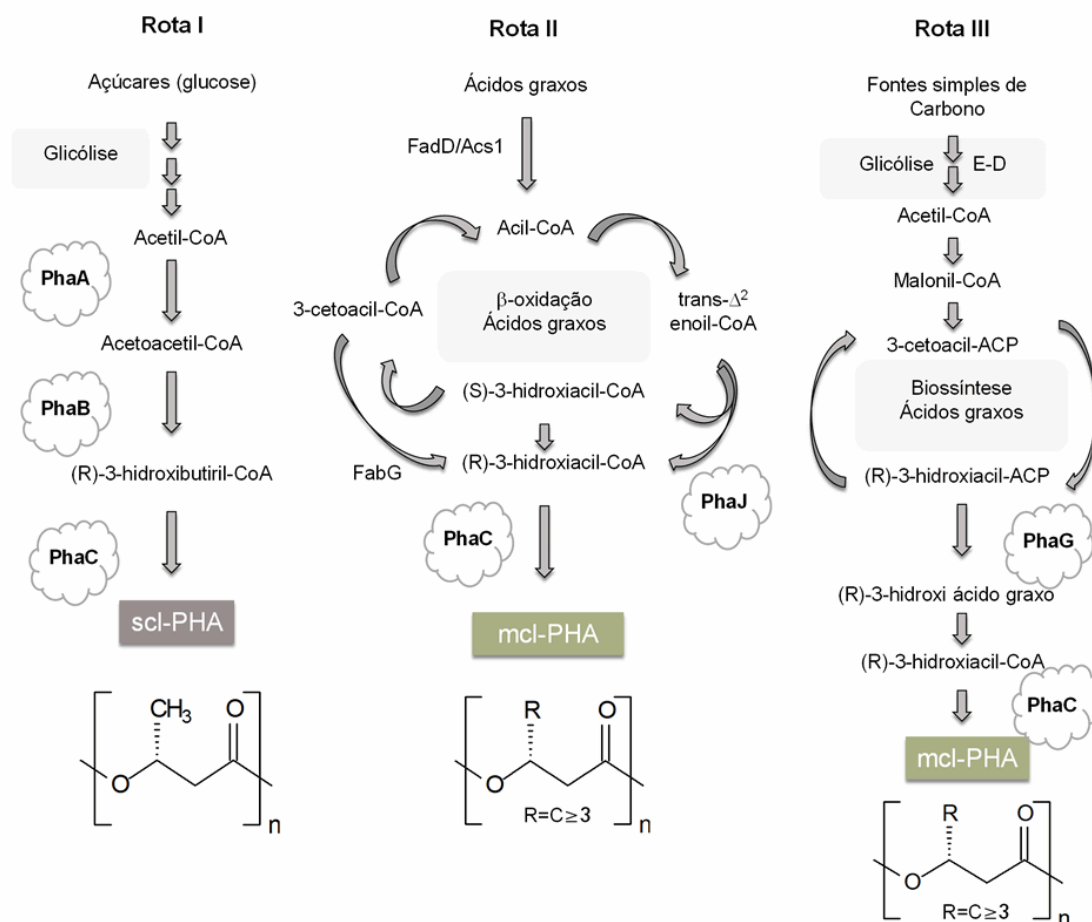


Figura 25 Esquema Três vias metabólicas envolvidas na síntese do PHA utilizadas por bactérias para criar precursores de PHA. A via I é predominantemente usada em organismos produtores de PHB, enquanto as vias II e III estão presentes nas bactérias, produtoras de mcl-PHA. As enzimas são indicadas, adjacentes às setas; processos envolvendo muitas etapas são indicados por retângulos arredondados: Glicólise, a via de Entner-Doudoroff (E-D), bem como os ciclos de oxidação β e biossíntese de ácidos graxos. Os PHAs produzidos são indicados com a estrutura química do monômero PHA resultante (Adaptada ¹⁴¹)

As vias de síntese de PHA resumidas e mais estudadas são discutidas a seguir. A Rota I, começando do açúcar para o scl-PHA, especialmente o PHB, foi utilizada como fonte de carbono para produzir acetil-CoA, seguida pelo metabolismo para acetoacetyl-CoA e 3-hidroxiacil-CoA, entrando no processo de polimerização para formar preferencialmente o P(3HB). A Rota II começa a partir de ácidos graxos como substrato para entrar no ciclo de β oxidação, levando à formação de monômeros do tipo R-3-hidroxiacil-CoA para a maioria da síntese de mcl-PHA ¹⁴². A via III direciona acetil-CoA para malonil-CoA e 3-cetoacil-ACP para formar monômeros R-3-hidroxiacil-CoA. A glicose também foi usada como fonte de carbono para produzir novos PHA com produtos de alto valor agregado, como o P(3HP), que

será discutido a seguir ¹⁴³. Geralmente, acredita-se que as sintases da classe IV preferem os monômeros do tipo scl-PHA, como 3-HB (C4) e 3-HV (C5), para polimerização, mas outros monômeros também podem ser polimerizados como componentes menores ³⁸ com a adição dos precursores 2HP, 3HHx, 3HO, 4HB e 6HHx. Assim, os PHAs de copolímeros são produzidos com os monômeros adicionados em proporções menores ^{144,145}.

No entanto, os subtipos PHA de IVm e IVc mostram diferentes especificidades de substrato. Por exemplo, precursores de 4HB não podem ser incorporado no PHA por *Bacillus megaterium*, mas podem sê-lo em copolímeros por *Bacillus cereus*. Esses resultados indicam que o subtipo IVc da PHA sintase pode ter uma especificidade mais ampla do substrato do que o subtipo IVm, que também foi mostrado *in vivo* por ensaios enzimáticos em trabalhos anteriores ^{38,146}. Estudos mais específicos para PHA sintases de *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus licheniformis* seriam necessários para elucidar as rotas utilizadas nos cultivos testados neste trabalho, pois não foram adicionados precursores específicos, apenas composição diferencial das fontes de carbono.

5.4.3 PHA 3: Poli-3-hidroxi-butirato-co-hidroxi-propionato P(3HBcoHP)

Os cromatogramas obtidos por análise GPC apresentaram um perfil bimodal na distribuição de massa no cultivo com os dois microrganismos no meio misto de farelo de trigo e pele de amendoim, sendo: Mn: $1,0 \cdot 10^5$ Da / $0,91 \cdot 10^4$ Da e relação Mw/Mn: 1,97 e 1,16 no cultivo com *Bacillus licheniformis*, e Mn: $1,0 \cdot 10^5$ Da / $0,96 \cdot 10^4$ Da e relação Mw/Mn de 2,03 e 1,12 no cultivo com *Bacillus amyloliquefaciens*.

A indicação do tipo de estrutura do PHA foi obtida a partir dos resultados das análises de RMN ¹H e ¹³C. A Figura 26 (a) mostra o espectro de ¹H RMN com os deslocamentos químicos (δ) de PHA atribuídos para PHB e PHP, conforme demonstrado pelo grupo metino (CH) em 5,17 e 5,19 ppm, grupo metileno (CH₂) em 2,37 e 1,27 ppm, o grupo metil (CH₃) em 1,61 ppm, em 0,84 pode ser observada a presença de prováveis grupos hidroxila primários (OH) ¹³³.

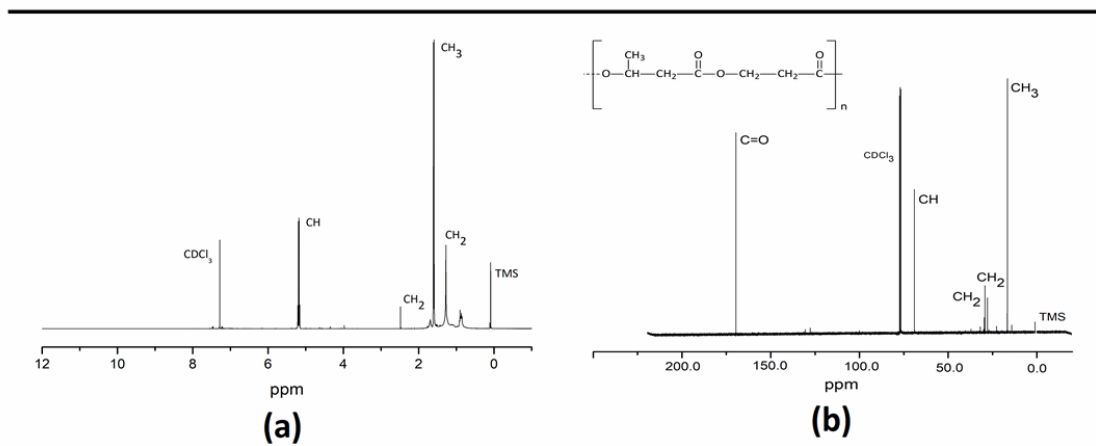


Figura 26 (a) Espectro RMN ^1H e (b) Espectro RMN ^{13}C do PHA obtido em meio de cultivo HA_TR+PE com *B. amyloliquefaciens*

As varreduras de RMN ^{13}C são mostradas na Figura 26 (b). Quatro tipos de carbono podem ser identificados: Os picos em 169,1 e 170,1 ppm representam o grupo carbonila (C=O), 69,0 ppm do grupo (CH), 29,2 e 28,7 ppm do grupo metileno (CH_2) e 16,3 ppm no grupo metil (CH_3)¹⁴⁷. Estes resultados indicam que a estrutura do material pode ser considerada de um copolímero de poli-3-hidroxi-butirato-co-hidroxi-propionato, P (3HBcoHP).

Os espectros MALDI-TOF-MS obtidos no modo de reflexão positiva mostraram que o espectro é dominado por uma série de picos de íons que correspondem a espécies de unidades intactas. A Figura 27 mostra uma expansão na faixa de massa (600-1600) do espectro de massas juntamente com as atribuições m/z 158,15 de vários dos picos. No detalhe, a estrutura de P(3HBcoHP) sugerida^{134,143}. Os picos de fragmentos emitidos podem ser descritos como sendo compostos por um número variável de unidades ($n = 158,15$ Da). O pico encontrado em $m/z = 655,58$ pode ser atribuído como um fragmento indicado como $[\text{P}(3\text{HBcoHP})+\text{Na}^+]$ e $m/z = 4 \times 158,15 + 23 = 655,58$ Da.

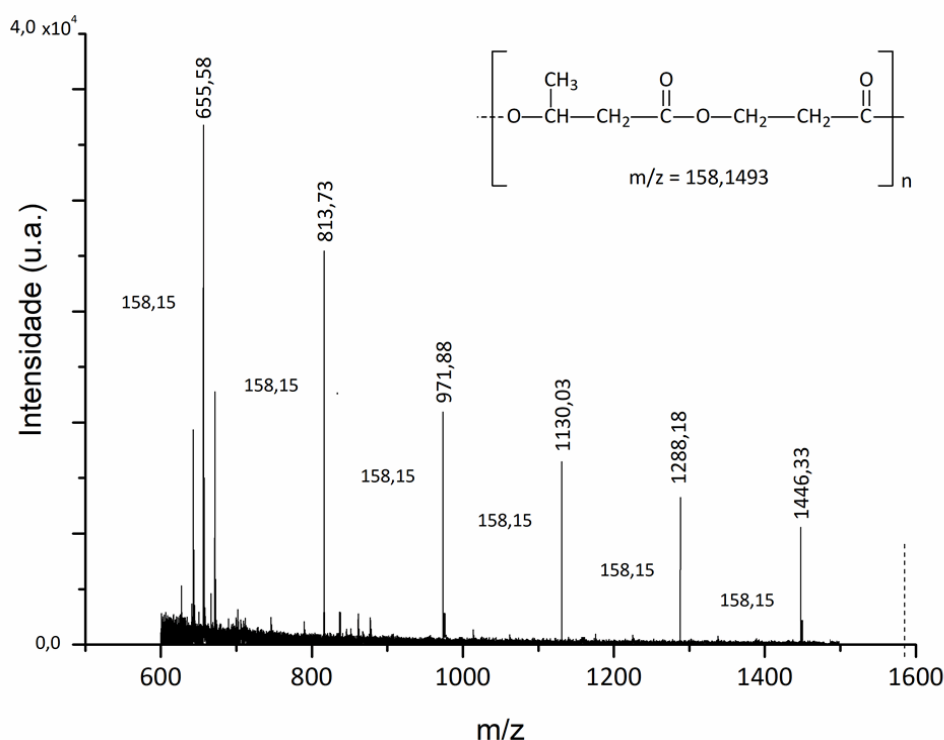


Figura 27 Espectro MALDI TOF MS do PHA em modo refletor positivo no fragmento entre $m/z = 600-1600$. No detalhe, a estrutura sugerida do copolímero P(3HBcoHP)

Os óleos extraídos durante a hidrólise da pele de amendoim não foram removidos na preparação do meio de cultivo e, embora não quantificados, sugerem interferência na composição do copolímero obtido. De acordo com os valores de referência encontrados no manual de Características Físicas e Químicas de Óleos, Gorduras e Ceras da AOCS (*American Oil Chemists Society*)¹⁴⁸ diferentes ácidos graxos compõem a pele do amendoim, entre eles o ácido behênico (um ácido graxo saturado com 22 carbonos de cadeia linear, de fórmula química $C_{21}H_{43}COOH$, entre 2-4%)¹⁴⁹. As espécies de *Bacillus* são capazes de modificar seus padrões de metabolismo de ácidos graxos para se adaptar a uma ampla gama de mudanças ambientais, incluindo alterações no meio de crescimento, temperatura, condições de processamento de alimentos e pH. Como muitas outras bactérias Gram-positivas, as cepas de *Bacillus* exibem um sistema bem definido de síntese II de ácidos graxos que é equilibrado com uma via de biossíntese de ácidos graxos como mostrado no Esquema da Figura 25 respondendo com eficiência às necessidades da célula¹⁵⁰.

Diferentes copolímeros de PHA foram obtidos pela combinação de substratos orgânicos, ácidos e alcoóis e citados na literatura. Copolímeros de P(3HBcoHP) com composições de P(3HP) de 0 a 26% em mol foram produzidos por *Alcaligenes latus*

a partir de substratos de carbono misto de ácido 3-hidroxi propiônico e sacarose como fontes de carbono ¹⁵¹.

O óleo de amendoim rico em ácidos graxos saturados já foi usado como fonte de carbono a 2% (v/v) para a produção de filmes de um novo PHA em cultivo de dois estágios com o microrganismo *Cupriavidus necator*. Foi obtido um heteropolímero de PHA composto por 98,2% em mol de 3-hidroxi butirato, 0,75% em mol de 3-hidroxi valerato e 1% em mol de hidroxi alcanoato de cadeia média (HA) ¹⁵².

Análises térmicas do copolímero P3HBcoHP são mostradas nas curvas de DSC e TG na Figura 28 (a) e (b), respectivamente.

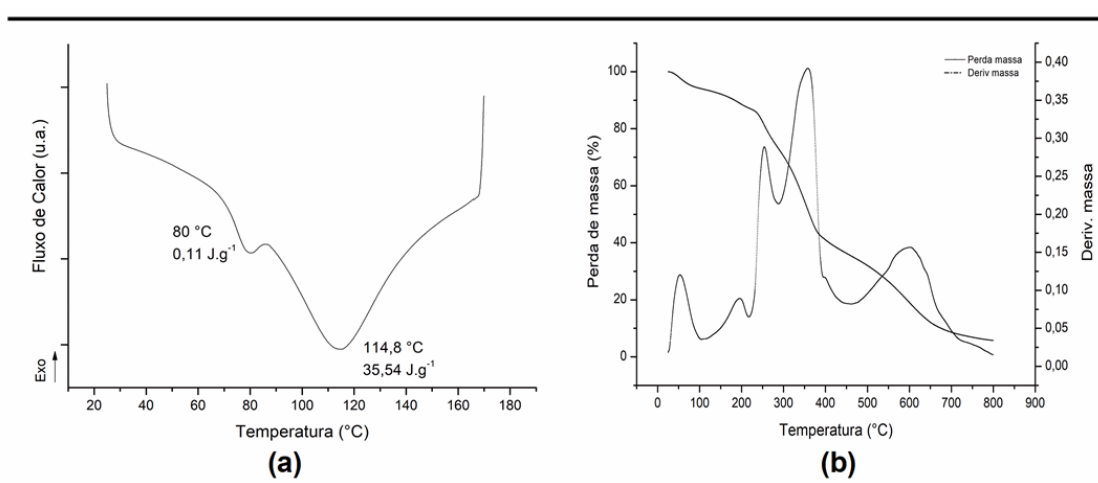


Figura 28 Curvas de DSC (a) e TG (b) obtidas do P(3HBcoHP) do cultivo misto de farelo de trigo e pele de amendoim com *B. amyloliquefaciens*

A curva de DSC da Figura 28 (a) mostra duas temperaturas: $Tm_1 = 80 \text{ °C}$ e $Tm_2 = 114,8 \text{ °C}$. Trabalhos anteriores mostraram que os picos do ponto de fusão tendem a mudar para temperaturas mais baixas com um aumento do conteúdo de monômeros de 3HP e, os múltiplos picos de fusão são usuais nestes copolímeros, as posições e intensidades destes picos variam conforme a concentração de 3HP na composição com a temperatura de fusão reduzindo de 149,3 °C até 43,9 °C com adição de percentuais entre 8,5 e 60,5% em mol de 3HP, respectivamente ¹⁵³.

A análise termogravimétrica do copolímero Figura 28 (b) mostrou estabilidade térmica das amostras na faixa de temperatura de 30 a 180 °C e a degradação térmica com perda de massa ocorreu em três estágios: a primeira perda de massa entre 225 e 312 °C (em torno de 33%), entre 312 e 389 °C (57,7%) e degradação rápida até 534 °C (71,6%). A degradação total ocorreu a 700 °C.

Considerando os dados obtidos neste estudo, com a $T_{m2} = 114,5 \text{ }^\circ\text{C}$ poderíamos calcular um percentual de P3HP em torno de 20%. Quando vários picos de fusão ocorrem, os picos em temperaturas mais altas podem ser relacionados pela reorganização do cristal no caso de menor taxa de aquecimento, enquanto os picos nas temperaturas mais baixas podem estar relacionados às verdadeiras temperaturas de fusão^{135,154}. A cristalinidade e a temperatura de transição vítrea não foram determinadas, no entanto a coexistência dessas duas transições térmicas sugere a existência de uma separação de fases dos dois polímeros.

5.4.4 PHA 4: Poli-3-hidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato P(3HBcoHV)

Os cromatogramas obtidos por análise GPC apresentaram-se como no copolímero anterior: um perfil bimodal na distribuição de massa no PHA obtido do cultivo com os dois microrganismos, no meio misto de bagaço de cana e farelo de trigo, apresentando: $M_n: 1,12 \cdot 10^5 \text{ Da} / 0,73 \cdot 10^4 \text{ Da}$ e relação $M_w/M_n: 1,69$ e $1,24$ no cultivo com *Bacillus licheniformis*, e $M_n: 1,3 \cdot 10^5 \text{ Da} / 0,71 \cdot 10^4 \text{ Da}$ e relação M_w/M_n de $1,57$ e $1,12$ no cultivo com *Bacillus amyloliquefaciens*. O meio de cultivo baseado em bagaço de cana nos ensaios anteriores apresentou bom acúmulo de PHA nos cultivos com *Bacillus licheniformis*, em torno de 83,4%, e na combinação deste meio com farelo de trigo este microrganismo também obteve melhor rendimento após a extração do PHA: 81,1%.

A indicação do tipo de estrutura do PHA foi obtida a partir dos resultados das análises de RMN ^1H e ^{13}C do cultivo com *Bacillus amyloliquefaciens*. Os espectros de RMN do PHA obtido por *Bacillus licheniformis* não permitiram a confirmação da mesma estrutura pela presença de fragmentos e/ou contaminantes na amostra e foi considerada como um possível P(3HBco3HA_{MCL}).

A Figura 29 (a) mostra o espectro de ^1H RMN com os deslocamentos químicos (δ) de PHA atribuídos para PHB e PHV. Observa-se um multipletto desblindado em (δ) 5,17 ppm que corresponde ao grupo metino (CH). Há a presença de um sinal em (δ) 2,44 e 2,24 ppm, referente ao hidrogênio metínico (CH₂) da estrutura do PHBV, atribuído na literatura como um dubleto de quadrupletos^{155,156}. O grupo metil da unidade 3-HB produz um dubleto em 1,26 ppm, enquanto a metila atribuída à unidade de 3-HV produz um multipletto em 0,92 ppm. O grupo metileno do valerato apresenta um sinal em (δ) 1,59 ppm com complexa multiplicidade e

alargamento referente ao acoplamento dos hidrogênios metínico e metílico próximos.

As varreduras de RMN ^{13}C são mostradas na Figura 29 (b). Quatro tipos de carbono podem ser identificados: O pico em 170,12 e 169,8 ppm representam a presença do grupo carbonila ($\text{C}=\text{O}$), deslocamentos (δ) 69,0 e 68,6 ppm do grupo (CH), 41, 29 e 23 ppm dos grupos metileno (CH_2) e 19,0 e 16,3 ppm nos grupos metílicos (CH_3)^{157,158}. Estes resultados indicam que a estrutura do material pode ser considerada como do copolímero de poli-3-hidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato, P(3HBco3HV).

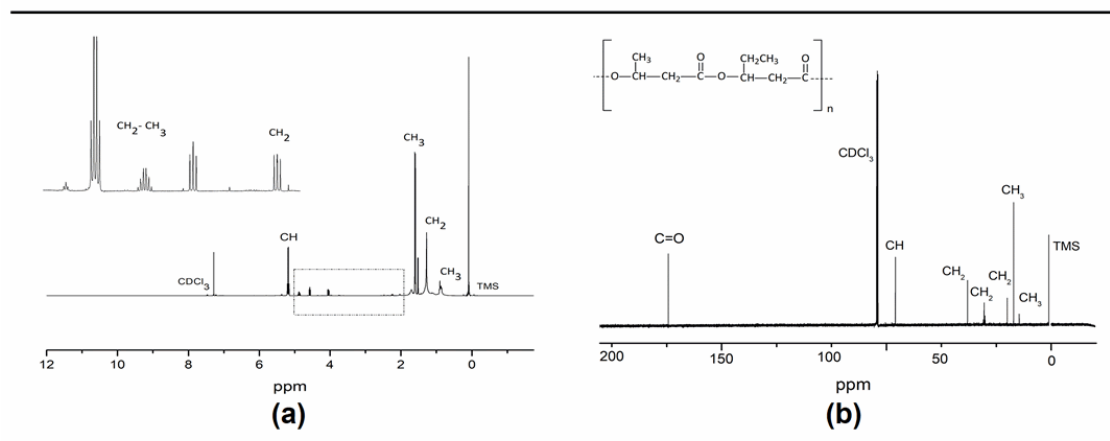


Figura 29 (a) Espectro RMN ^1H e (b) Espectro RMN ^{13}C do PHA obtido em meio de cultivo hidrolisado ácido de bagaço de cana e farelo de trigo com *B. amyloliquefaciens*

Os espectros MALDI TOF MS obtidos no modo de reflexão positiva mostraram que o espectro é dominado por uma série de picos de íons que correspondem a espécies de unidades intactas. A Figura 30 (a) mostra o espectro em modo linear e refletor positivo entre 30-140 kDa e em (b) uma expansão na faixa de massa (71000-74000) do espectro MALDI TOF MS juntamente com as atribuições $m/z = 186,20$ Da de vários dos picos. No detalhe, a estrutura de P(3HBcoHV) sugerida¹³⁴.

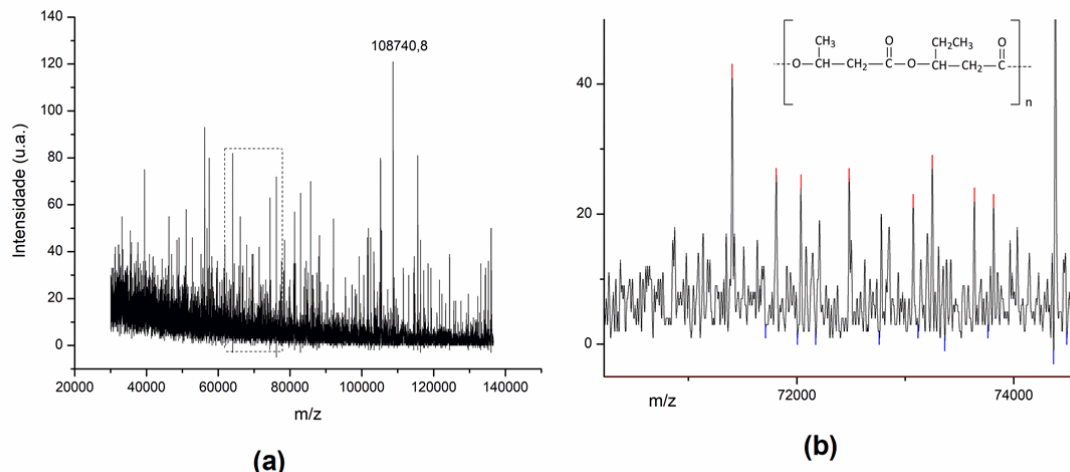


Figura 30 (a) Espectro MALDI TOF MS do PHA em modo refletor positivo entre 30-140 kDa, (b) expansão do fragmento entre $m/z = 71000-74000$. No detalhe, a estrutura sugerida do copolímero P(3HBco3HV)

Os picos de fragmentos emitidos podem ser descritos como sendo compostos por um número variável de unidades ($n = 186,20$ Da). O pico encontrado em $m/z = 108740,8$ pode ser atribuído como um fragmento maior indicado como [P(3HBcoHV)] e $m/z = 584 \times 186,20 = 108740,8$ Da. A menor resolução do espectro pode ter sido ocasionada pela não adição de solução de cationização de NaCl ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).

As curvas de DSC e TG são mostradas na Figura 31 (a) e (b), respectivamente. A curva de DSC da Figura 31 (a) mostra três sinais em destaque: um pico principal relacionado à temperatura de fusão $T_m = 156,8$ °C, um ombro em $146,6$ °C e uma leve transição em $70,3$ °C. Em estudos anteriores realizados, Bayari e colaboradores¹⁵⁹ identificaram que o valor da temperatura de fusão (T_m) do biopolímero 3HB foi 175 °C, enquanto o valor T_m dos biopolímeros 3HV é 108 °C. Segundo estes autores, o valor de T_m do copolímero P3HBco3HV depende da fração de 3HV e verificaram que o valor de T_m diminui com o aumento da fração de 3HV. Os dados obtidos por DSC apresentados neste trabalho revelaram que a temperatura de fusão variou de 140 °C para P3HBco14%3HV e $160,8$ °C para P3HBco11,3%3HV. Com os dados obtidos deste estudo, a concentração de HV neste copolímero deve se concentrar entre 10 e 12%. A cristalinidade calculada pela entalpia de fusão medida pode ser considerada baixa: em torno de 22,8%.

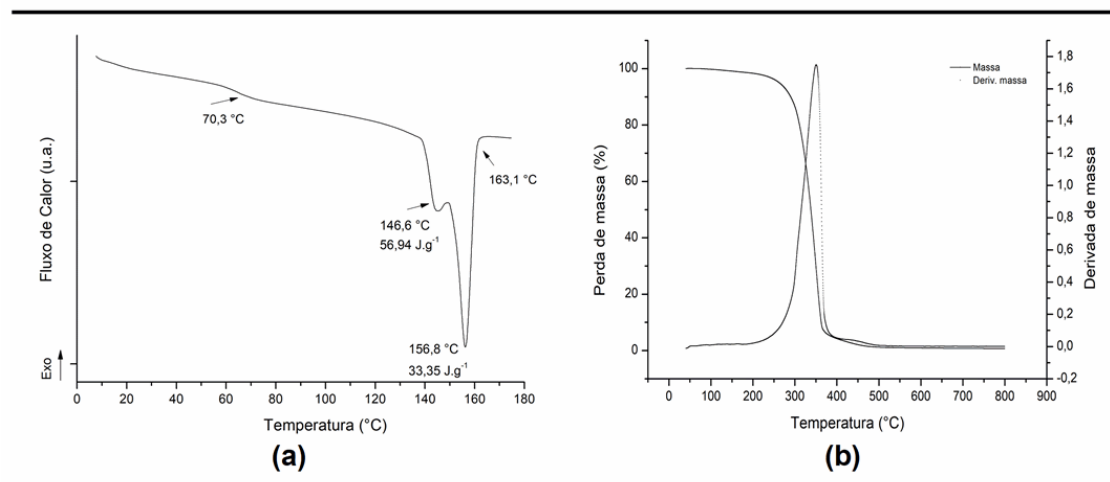


Figura 31 Curvas DSC (a) e TG (b) obtidas do P(3HBcoHV) do cultivo misto de bagaço de cana e farelo de trigo com *B. amyloliquefaciens*

As análises termogravimétricas do copolímero na Figura 31 (b) mostraram estabilidade térmica na faixa de temperatura de 30 a 256 °C e a degradação térmica com perda de massa ocorreu em dois estágios: a primeira perda de massa entre 256 e 319 °C (em torno de 23%), entre 319 e 365 °C (64,8%). A degradação total ocorreu em 600 °C com residual mínimo de 0,69%. Para o biopolímero P(3HBcoHV) comercial (PHB Industrial) a temperatura de degradação inicial é de 264,2°C, para composição com 6% de hidroxivalerato.

5.4.5 PHA 5: Poli-3-hidroxifenilbutirato P(3HFB)

Até aqui, os homopolímeros e copolímeros obtidos apresentaram estruturas de composição monomérica relacionada diretamente ao tipo de fonte de carbono utilizada como descrito na literatura ¹¹. O cultivo misto de pele de amendoim, bagaço de cana e farelo de trigo (HA_PE+CA+TR) com reforço de farelo de trigo em biorreator de 2 L produziu um biopolímero com estrutura diferente das anteriores. Os dados obtidos da caracterização deste PHA indicou a presença de estruturas concomitantes sintetizadas pelos dois microrganismos e identificada de maneira mais clara nos cultivos com *Bacillus licheniformis*. Antes de 1995, aproximadamente 90 tipos de PHAs, com várias estruturas e grupos funcionais (saturados, insaturados, fenoxi, epóxi, ciano, grupos cloro, bromo e fenil) foram identificados como monômeros de PHA ³⁷. A maioria destes biopolímeros era obtida a partir do fornecimento à bactéria de alguma substância estruturalmente relacionada ao

monômero que se desejava inserir, ou seja, que funcionasse como precursor para a síntese do mesmo. Atualmente, mais de 160 diferentes grupos foram identificados como monômeros de PHA, que mostram uma gama e diversidade de propriedades, desde termoplásticos a elastômeros^{8,143,160}. Algumas destas estruturas são mostradas nas Figuras do Anexo I.

O PHA obtido nestes meios com *Bacillus amyloliquefaciens* foi identificado como P3HBcoHV e sua caracterização foi similar aos dados obtidos do cultivo de bagaço de cana e farelo de trigo descrito anteriormente. Os cultivos com *Bacillus licheniformis* produziram uma estrutura diferente de poli-3-hidroxi-fenil-butirato: P(3HFB).

Os cromatogramas obtidos por análise GPC apresentaram valores similares na distribuição de massa molar no cultivo com os dois microrganismos, sendo: Mn: 59865 Da no cultivo com *Bacillus licheniformis* e Mn: 57287 Da no cultivo com *Bacillus amyloliquefaciens*.

A indicação do tipo de estrutura do PHA obtida de *Bacillus licheniformis* a partir dos resultados das análises de RMN ¹H e ¹³C é mostrada na Figura 32 (a) e (b), respectivamente. O espectro de RMN ¹H na Figura 32 (a) mostra quatro principais deslocamentos químicos (δ) identificados, como: (H-C) do anel aromático em 7,3 ppm, um grupo metileno (CH₂) ligado ao anel aromático em 5,2 ppm, um dubleto do grupo metino (CH) em 1,6 ppm e do metileno (CH₂) em 1,3 ppm. Em 0,86 ppm pode ser observada a presença de hidrogênio de prováveis grupos hidroxila primários (OH)¹⁶¹.

O espectro de RMN ¹³C, na Figura 32 (b), apresentou alguns deslocamentos não identificados claramente que podem estar relacionados à presença de concomitantes ou fragmentos gerados durante a solubilização para análise. Foram identificados os deslocamentos químicos (δ): em 169,6 ppm representa a presença do grupo carbonila (C=O), em 130,5 ppm relacionado aos carbonos do anel aromático (C-H), carbono do anel ligado ao grupo (CH₂) em 127,7 ppm, no deslocamento em 69,0 ppm do grupo (CH), 29,7 ppm do grupo metileno (CH₂) e 27,1 ppm do grupo metileno ligado ao anel (CH₂). Estes resultados indicam que a estrutura do material pode ser considerada como a estrutura de poli 3-hidroxi-fenil-butirato: P(3HFB).

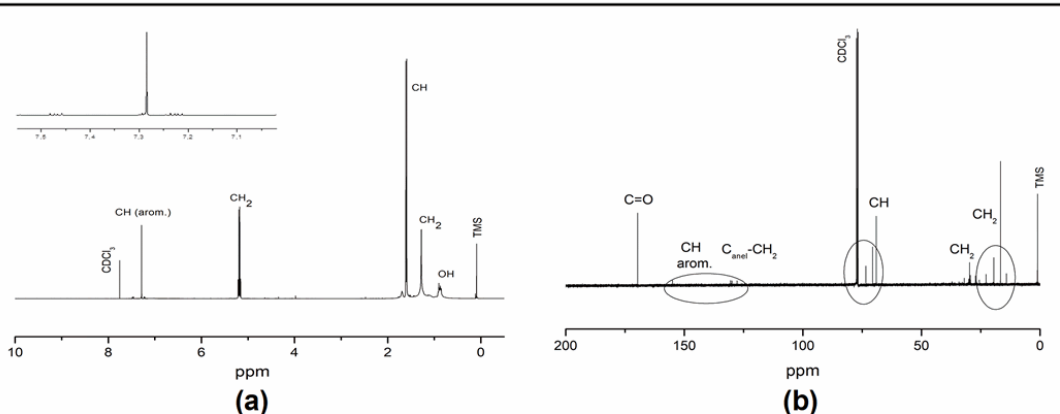


Figura 32 (a) Espectro RMN ^1H e (b) Espectro RMN ^{13}C do P(3HFB) obtido em meio de cultivo HA_PE+CA+TR com *B. licheniformis*

A estrutura do PHA foi analisada de forma complementar por ^{13}C RMN com amostra em forma sólida em equipamento com campo magnético de Agilent 500 MHz, o espectro obtido é mostrado na Figura 33. Do espectro de RMN ^{13}C mostrado na Figura 33 foram identificados os seguintes deslocamentos químicos (δ): em 168,3 ppm representa a presença do grupo carbonila (C=O), carbono do anel ligado ao grupo (CH₂) em 127,9 ppm, em 101,0 ppm relacionado aos carbonos do anel aromático (C-H), no deslocamento em 70,0 ppm do grupo (CH), 58,5 ppm do grupo metileno (CH₂) e 27,8 ppm do grupo metileno ligado ao anel (CH₂). Estes resultados corroboram com os resultados anteriores e a estrutura do PHA pode ser considerada como de poli 3-hidroxi-fenil-butirato: P(3HFB).

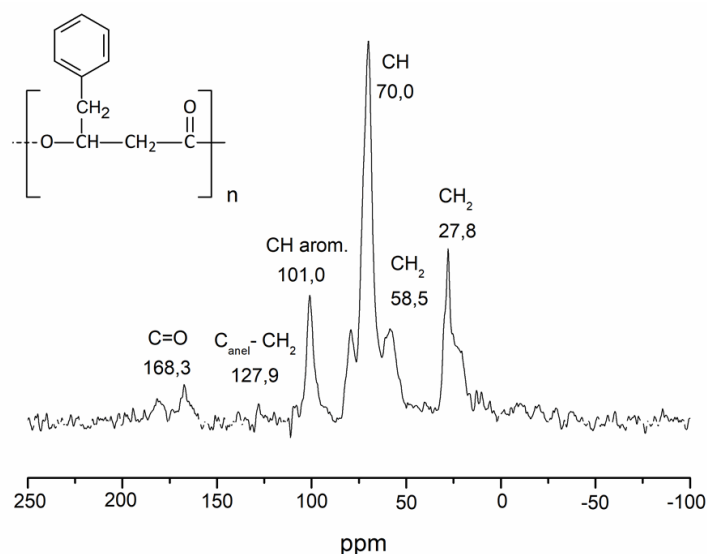


Figura 33 Espectro RMN ^{13}C do PHA em forma sólida, no detalhe a estrutura sugerida de poli 3-hidroxi-fenil-butirato: P(3HFB)

O espectro de MALDI TOF MS do P(3HFB) é mostrado na Figura 34. Os múltiplos picos emitidos foram identificados em intervalos que correspondem a unidades ($n = 162,08$ Da). O pico mais alto identificado em $m/z = 59483,4$ Da pode ser atribuído como um fragmento que corresponde a massa molar de P3HFB com: $m/z = 367 \times 162,08 = 59483,4$ Da.

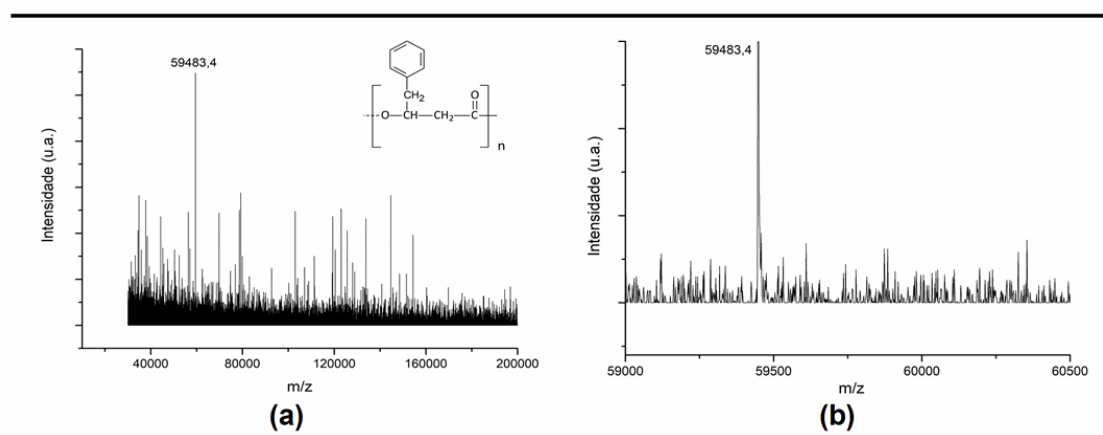


Figura 34 (a) Espectro MALDI TOF MS do PHA em modo linear refletor positivo de 30 a 210 kDa, no detalhe, a estrutura sugerida do biopolímero P(3HFB) e (b) expansão do fragmento entre $m/z = 59000$ e 60500 Da

Estrutura de PHA semelhante é descrita em diferentes patentes e artigos há mais de 20 anos e a maioria das publicações se referem ao cultivo de *Pseudomonas oleovorans* que produz um PHA (Poli-3-hidroxi-5-fenilvalerato) utilizando como substrato a unidade de ácido 5-fenilvalérico. O meio de cultura contém o composto que é um resíduo com uma estrutura de anel (fenil) em um teor que varia preferencialmente de 0,02 a 0,2% (p/v). Normalmente, o meio de cultura contém o substrato como fonte de carbono e fonte de nitrogênio para o crescimento do microrganismo e fonte de energia para a produção de um polialcanoato em uma concentração que varia de preferência de 0,2 a 2%, na fase exponencial de crescimento até a fase estacionária o microrganismo incorpora os outros componentes do meio formando 3-hidroxialcanoatos com diferentes grupos funcionais ¹⁶².

De acordo com o Manual Bergey de Sistemática Bacteriológica ¹⁶³ uma das principais diferenças no metabolismo entre os dois microrganismos deste estudo é o fato de que *Bacillus amyloliquefaciens* utiliza somente o citrato como fonte de carbono. *Bacillus licheniformis* é capaz de metabolizar citrato e propionato e

decompor polissacarídeos e pectina (ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose).

Considerando as diferenças nas composições dos resíduos agroindustriais hidrolisados podemos sugerir que ocorreu uma alteração na rota metabólica do *Bacillus licheniformis* que resultou no acúmulo de um biopolímero distinto dos obtidos nas sínteses anteriores. O ácido ferúlico é o composto fenólico mais abundante no grão de trigo, localizado principalmente no farelo. A bioacessibilidade do ácido ferúlico, ácido p-cumárico e ácido sinápico foi avaliada e os principais metabólitos obtidos por hidrólise foram os ácidos 3-(3-hidroxifenil) propiônico e 3-fenilpropiônico derivados do ácido cinâmico ¹⁶⁴.

Uma análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC) e HPLC-MS ¹⁶⁵ seriam necessárias para detalhamento da composição dos meios de cultivo e de ensaios bioquímicos para esclarecimento da rota metabólica utilizada pelo *Bacillus licheniformis*.

Análises térmicas de DSC e TGA são mostradas na Figura 35 (a) e (b), respectivamente.

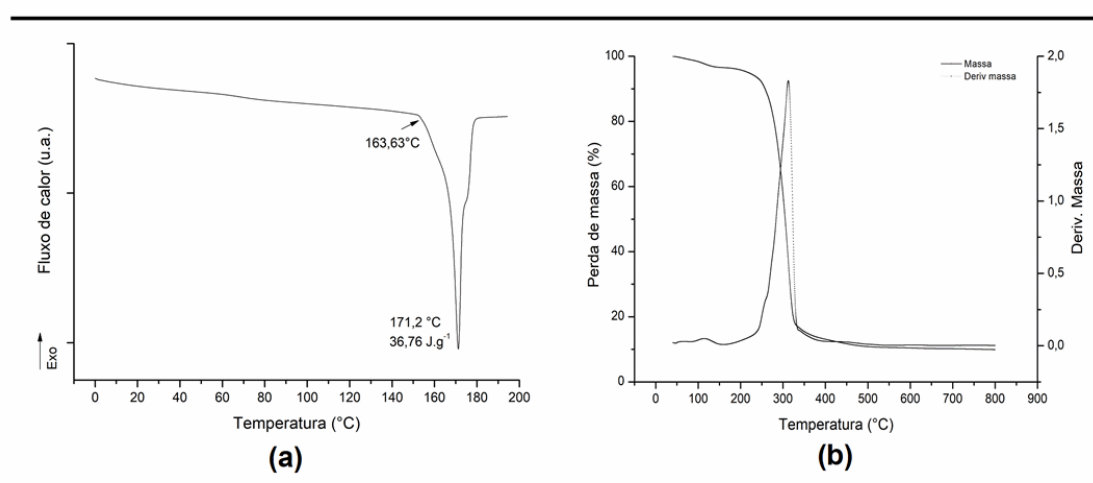


Figura 35 Curvas DSC (a) e TG (b) obtidas do P(3HFB) do cultivo misto de pele de amendoim, bagaço de cana e farelo de trigo com *B. licheniformis*

A curva de DSC do P3HFB é mostrada na Figura 35 (a), a partir da qual foi identificado um pico estreito centrado em 171,2 °C referente à temperatura de fusão (T_m) e entalpia de fusão de 36,76 J.g⁻¹. A temperatura de transição vítrea (T_g) e cristalinidade não foram determinadas por falta de referência do PHA 100% cristalino. Os biopolímeros apresentaram temperatura de fusão do P3HB obtido dos cultivos com farelo de trigo e *Bacillus amyloliquefaciens* (171,3 °C), no entanto os

ensaios de tração e análise física dos filmes obtidos mostraram maior flexibilidade e ductibilidade. No termograma obtido por TGA Figura 35 (b), as amostras mostraram-se termicamente estáveis em uma faixa de temperatura de 30 a 190 °C e mostraram degradação total em um único estágio entre 250 e 300 °C.

5.5 ESCALONAMENTO EM BIORREATOR DE 35 L

Para ensaios em biorreator de 46,5 L foram eleitos dois tipos de cultivo com *Bacillus amyloliquefaciens* em meio hidrolisado: farelo de trigo puro e farelo de trigo com pele de amendoim. Para avaliação geral do rendimento do bioprocessamento, amostras foram coletadas a cada duas horas após o inóculo do microrganismo e em $t = 20, 24, 30$ e 48 h. O tempo total do processo considerando a fase de latência do microrganismo de 8h, foi de 56 h. As concentrações de açúcares redutores totais foram consideradas nas concentrações de carbono orgânico total. A título de exemplo, o gráfico obtido a partir dos dados de cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* em meio de farelo de trigo e pele de amendoim é mostrado na Figura 36.

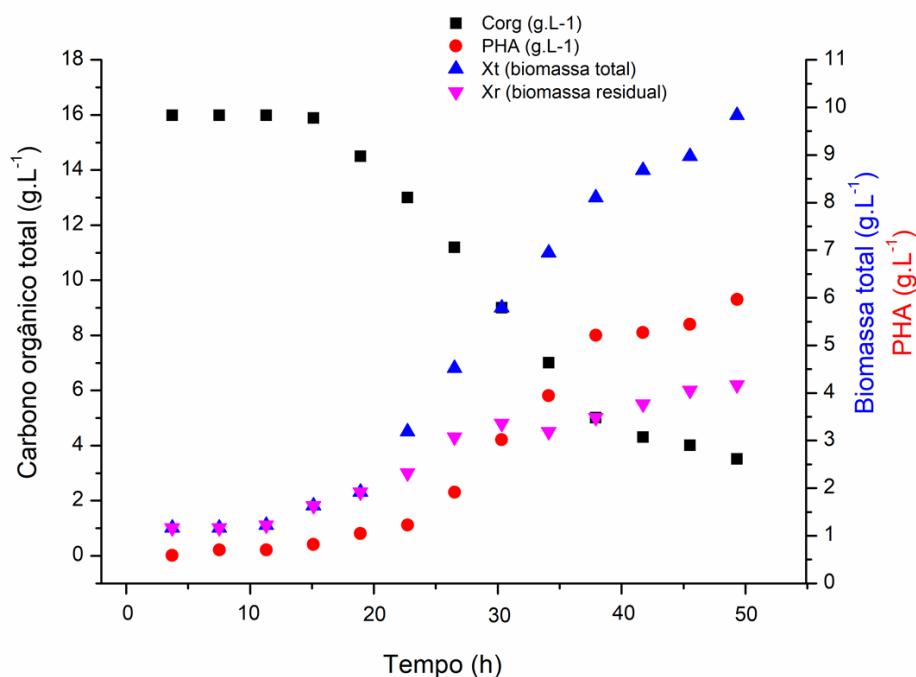


Figura 36 Ensaio em biorreator de 35 L: consumo de carbono orgânico total, biomassa celular total, PHA extraído, biomassa residual, em cultivo com hidrolisado ácido de farelo de trigo e pele de amendoim com *Bacillus amyloliquefaciens*

A concentração de biomassa celular total foi de $9,8 \text{ g.L}^{-1}$ e o PHA extraído correspondeu a 66,7% ($6,2 \text{ g.L}^{-1}$). Observa-se também a presença de carbono

orgânico não consumido ao final do processo ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$). A relação de rendimento de PHA produzido/biomassa agroindustrial foi de $0,062 \text{ (g}_{\text{PHA}}/\text{g}_{\text{res.}})$ e considerado satisfatório, P(3HBcoHP) foi produzido. Foram obtidos P3HB do cultivo com meio único de farelo de trigo com um decréscimo em torno de 15% em comparação ao rendimento obtido do meio misto de farelo de trigo e pele de amendoim: $7,8 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa total, 57,2% de PHA acumulado, correspondendo a $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ e rendimento $0,045 \text{ (g}_{\text{PHA}}/\text{g}_{\text{res.}})$.

Em recente revisão, Rodriguez-Perez e colaboradores avaliaram diferentes processos e seu escalonamento para produção de PHA empregando diferentes resíduos como fonte de matéria orgânica. Os processos, em geral, consistiram de três etapas principais: pré-tratamento, produção e extração/purificação e a maioria realizado em batelada. Os processos que usaram menos de 10 L de volume de trabalho foram considerados estudos em escala de laboratório, enquanto os estudos que usaram mais de 10 L de volume de trabalho foram considerados em escala piloto. Os processos em sistemas contínuos, com fornecimento contínuo de carbono e meios complementares são considerados ideais para produção em escala, no entanto, exigem a utilização de culturas puras e condições assépticas controladas para obtenção dos melhores resultados em escala industrial ¹⁶⁶. Os ensaios realizados em escala piloto forneceram informações importantes do bioprocessos e foi possível o reaproveitamento de água e recuperação de 98% do carbonato de polipropileno utilizado na extração. Ainda assim, é necessário um ajuste correto do projeto do processo às particularidades cinéticas dos microrganismos selecionados e substratos aplicados, além de alcançar alta produtividade e conversão completa do substrato nos processos de produção do PHA.

O processo de produção de PHA foi classificado em três fases: hidrólise dos resíduos (Fase I), adaptação/crescimento (Fase II) e produção / acumulação de PHA (Fase III). Como a fonte de carbono e nitrogênio de reforço foi adicionada após a adaptação dos microrganismos na Fase II, a produção e acumulação de PHA foram iniciadas no final da Fase II seguindo até o final da Fase III, no mesmo biorreator. Esta estratégia permite que o processo possa ser testado em maior escala com diferentes resíduos agroindustriais ¹⁶⁷.

Outros estudos que apresentaram Fase II e III no mesmo reator usaram algas ou bactérias fotossintéticas ^{168,169} ou culturas de bactérias puras com alto rendimento

de produção de PHA ^{170,171}. A produção e acumulação de PHA ocorreram somente na Fase III. A fonte de carbono usada na cultura foi armazenada principalmente como PHA. A Fase III foi normalmente separada da Fase II em um reator diferente. De fato, 75% dos estudos de laboratório relataram essas fases como separadas. Atualmente, o processo trifásico, que inclui uma fase de pré-tratamento para ajustar o material residual tornando-o apropriado como fonte de carbono é a mais empregada na produção de PHA. A integração da produção de PHA em processos como o tratamento de águas residuais, instalações de produção de hidrogênio ou fábricas de biodiesel podem melhorar as questões em relação ao custo e produtividade. Assim, a produção de PHA a partir de fluxos de resíduos exigirá processos flexíveis, que podem ser adaptados a diferentes fluxos de resíduos sazonais ajustando somente variáveis operacionais ⁵⁷.

5.6 CARACTERIZAÇÃO DOS GRÂNULOS DE PHA

Os grânulos de PHA foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e apresentaram diferenças entre os grânulos extraídos com hipoclorito de sódio e precipitação posterior com acetona e da extração com carbonato de polipropileno.

Observou-se uma estrutura mais lisa dos grânulos de PHA extraídos com carbonato de polipropileno como se os glóbulos iniciais acumulados nas células bacterianas se unissem formando estruturas em forma de bastão. As partículas menores formam aglomerados irregulares de tamanhos similares e mais fragmentado na extração com hipoclorito/acetona. Não foi observada a presença de estruturas lamelares. Como PHAs são acumulados intracelularmente é necessário que sejam digeridos os constituintes celulares e, deste modo, extrair o polímero acumulado. Como resultado dos dois tipos de extração em nossos ensaios observou-se menor redução de massa molecular e maior rendimento de extração com o uso de carbonato de polipropileno, que pode ser recuperado e reutilizado várias vezes sem purificação ²².

A Figura 37 ilustra os grânulos de PHA acumulados em célula bacteriana, imagem do PHA em pó e as micrografias comparativas dos biopolímeros após os dois tipos de extração.

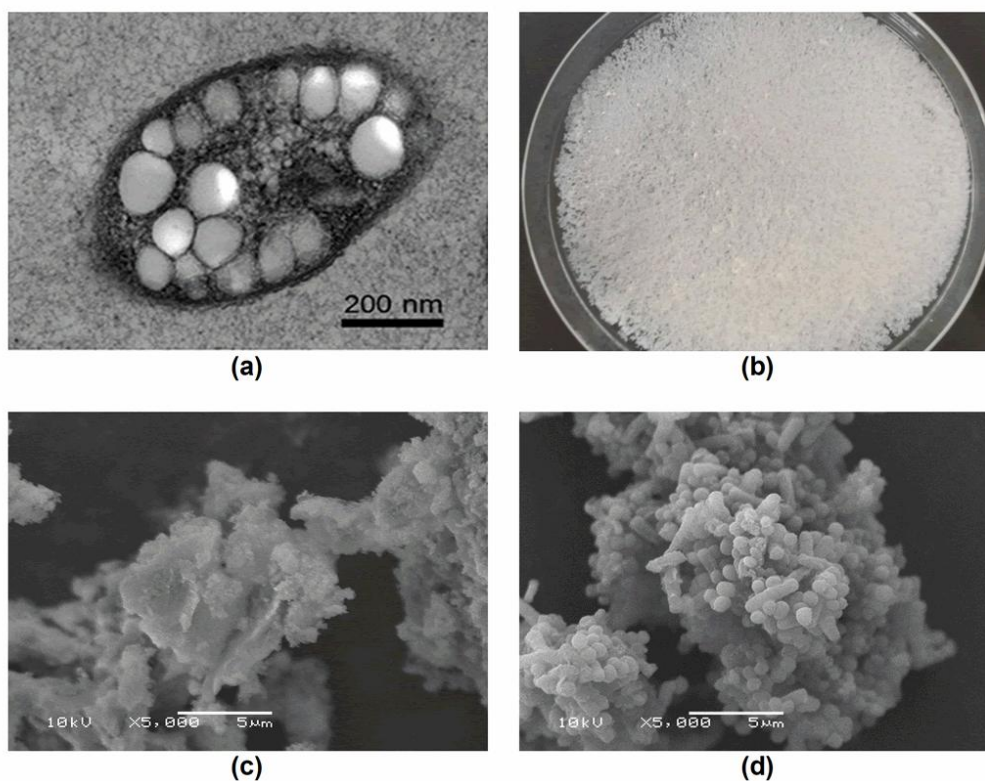


Figura 37 (a) Imagem de microscopia eletrônica de grânulos de PHA acumulados em célula bacteriana (Fonte:<https://lipidlibrary.aocs.org/>); (b) PHA em pó após extração; (c) Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura do PHA extraído com hipoclorito de sódio e precipitado com acetona e (d) Micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura do PHA extraído com carbonato de polipropileno.

As análises iniciais por microscopia eletrônica de varredura mostraram grânulos e aglomerados entre 2 e 20 μm de diâmetro. Ainda na célula, grânulos de PHA apresentam tamanhos que podem variar entre 0,02 e 0,5 μm ¹⁷².

O diâmetro das partículas e o potencial Zeta foram analisados como características importantes, pois estão diretamente ligados à estabilidade e dispersão das partículas em meio líquido¹⁷³. Nanopartículas poliméricas biocompatíveis e biodegradáveis tem sido bastante exploradas como suportes para entrega de fármacos e aplicações biomédicas¹⁷⁴ e estas informações são importantes para estudos futuros para aplicação dos PHAs obtidos neste trabalho.

Os polímeros em solução podem se apresentar na forma enovelada ou em glóbulos. Na conformação globular, interações de van der Waals fortes e atrativas entre os polímeros são inevitáveis e por sua vez, podem significar problemas de miscibilidade, formação de agregados e precipitação subsequente, tornando a

determinação do tamanho da partícula em uma tarefa não trivial quando analisadas somente por espalhamento de luz dinâmica (DLS)¹⁷⁵. Assim, os melhores resultados foram obtidos a partir de diluições de 1:200 e uso de ultrassom no preparo das amostras.

Os diâmetros de partícula obtidos por DLS representam os valores médios de possíveis aglomerados com valores entre 334 e 1480 nm e compatíveis com as massas moleculares de cada PHA calculados pela relação: $D \cong a.N^{1/3}$ onde, D: diâmetro da partícula, a: comprimento de ligação e N: grau de polimerização (número de unidades repetidas u.r.), descrita por Badasyan e colaboradores¹⁷⁵. Os valores de polidispersividade entre 0,5 e 0,8 indicam que as amostras não são homogêneas. A Tabela 10 mostra os valores de diâmetro de partícula obtidos em solução por DLS, por SAXS e medidas de potencial Zeta.

Tabela 10 Valores obtidos para diâmetro de partícula obtido por DLS e SAXS e Potencial Zeta (PZ) dos PHAs

PHA	DLS / Potencial Zeta			SAXS			
	Diâmetro (nm)	PDI	PZ (mV)	Dp1 (nm)	Dp2 (nm)	P2	P3
PHB	334	0,57	-38,2 ± 1,10	2,8	25,8	1,8	2,7
PHP	425	0,58	-37,2 ± 0,31	2,3	18,3	1,5	2,9
PHBcoHP	1110	0,82	-30,5 ± 2,31	2,8	21,5	1,7	2,8
PHBcoHV	1480	0,73	-33,7 ± 0,96	3,1	30,9	2,3	2,6
PHFB	712	0,52	-36,7 ± 2,41	5,2	46,4	2,0	2,7

PDI: polidispersividade; Dp1: diâmetro de partícula primária; Dp2: diâmetro de partícula no nível 2; P2: organização do fractal no segundo nível e P3: organização dos aglomerados no nível 3

Para estruturas fractais, é conhecido que a intensidade espalhada $I(q)$ segue uma lei de potência, $I(q) \sim q^{-P}$, onde P é uma dimensão fractal¹⁷⁶. Para fractais de massa, $1 < P < 3$, no segundo nível de organização foram obtidos valores que variaram entre 1,7 e 2,0, indicando claramente uma estrutura de fractal de massa com as ramificações desorganizadas sem a presença de estruturas lamelares. No terceiro nível, em valores de q entre 0,02 e 0,5 nm⁻¹, que se referem ao comprimento L entre 12 e 300 nm, o valor de P = 2,7, confirma a estrutura fractal de massa de aglomerados menos densos.

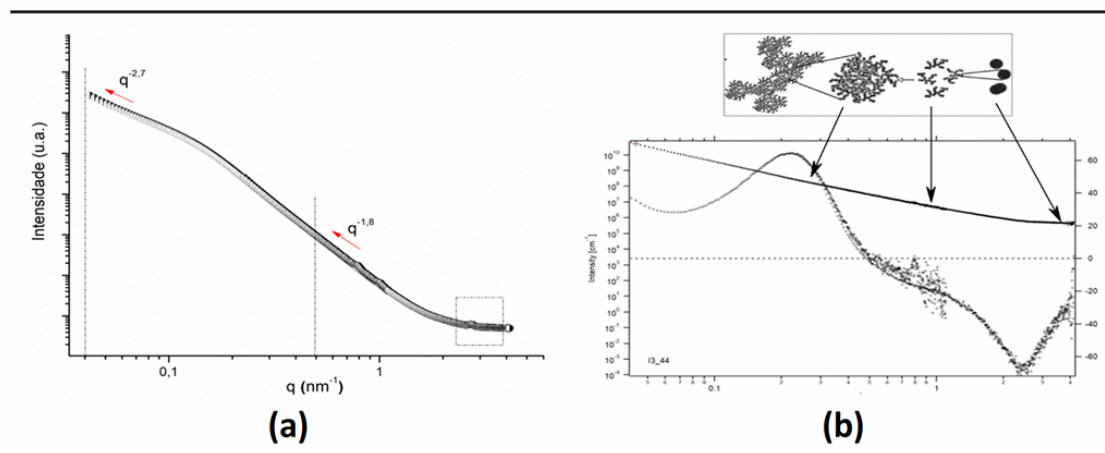


Figura 38 (a) Curva de SAXS da amostra de P3HB com os valores de q obtidos e (b) Distribuição dos tamanhos de partículas nos três níveis de organização, no destaque: diferentes níveis de organização das partículas

As medidas de carga na superfície dos PHAs obtidos por potencial Zeta mostraram estabilidade das suspensões com valores negativos acima de -30 mV. Os valores negativos podem ser atribuídos aos grupos funcionais contendo oxigênio, como grupos hidroxila terminais que conferem uma contribuição negativa adicional para o potencial Zeta.

5.7 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

A viabilidade celular das células MRC5 tratadas com os biopolímeros obtidos foi investigada. No ensaio NRU, amostras de copolímeros obtidos de *Bacillus amyloliquefaciens* em hidrolisado de pele de amendoim e farelo de trigo não mostraram toxicidade celular nas doses investigadas (Figura 39). Este resultado indica que os biopolímeros obtidos são toxicologicamente seguros para a linha celular MRC5 de mamíferos.

As células que crescem a partir de agregados celulares aderiram ao material e cresceram em comparação ao controle em todas as concentrações (1 a $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O citoesqueleto bem expresso mostrou que as células aderem ao biopolímero tornando-o um bom candidato a abordagens terapêuticas médicas como citado na literatura ¹⁷⁷.

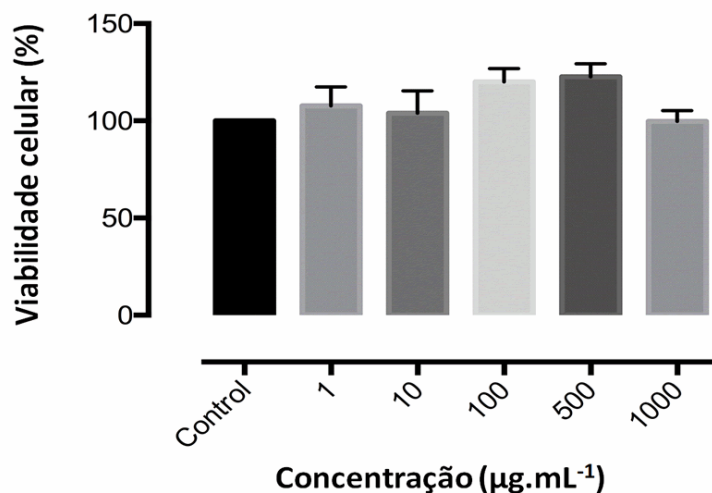


Figura 39 Viabilidade celular de células MRC5 após tratamento com P(HBcoHP). As células foram incubadas por 24 horas a 37 °C e 5% de atmosfera de CO₂ na presença de PHA nas concentrações de 1, 10, 100, 500 e 1000 µg.mL⁻¹. A percentagem de células viáveis foi determinada por ensaio de absorção de vermelho neutro. O controle sem adição de PHA foi definido como 100%. Cada barra representa a média ± DP de três experiências independentes

Os resultados obtidos para os biopolímeros P(3HB) e P(3HBcoHV) foram similares, com crescimento celular acima de 96% nas concentrações de 100 e 500 µg.mL⁻¹. À medida que as aplicações de PHAs biodegradáveis produzidos biologicamente se tornam áreas mais especializadas, a necessidade de controlar com precisão a composição da unidade de repetição e, conseqüentemente, as propriedades físicas desses polímeros se torna essencial ¹⁷⁸. Na literatura, a biocompatibilidade de PHA e PLA foi confirmada, onde fibras constituídas por P(3HBcoHV) e ácido polilático foram submetidas a estudos de biodegradabilidade e biocompatibilidade utilizando linhagem de fibroblastos humanos ¹⁷⁹.

Muitos estudos demonstraram que PHA é um material promissor para implantes devido à sua diversidade e propriedades de compatibilidade e biodegradabilidade em tecidos. É importante ressaltar que produtos de biodegradação PHA comuns, incluindo oligômeros e monômeros também não são tóxicos para as células e tecidos. Até agora nenhum estudo foi relatado para ter qualquer resultado de carcinogênese induzido por qualquer PHA ou seus produtos de biodegradação.

A biodegradação do PHA pode ser regulada pela copolimerização aleatória ou a combinação de PHA com PLA ou PLGA (poli ácido lático-co-ácido glicólico) que pode ajudar a controlar a biodegradação *in vitro* e *in vivo*. As diferentes composições

de monômeros de PHA têm sido exploradas no campo das aplicações biomédicas em diferentes condições fisiológicas e estão sendo usados para fazer dispositivos como: curativos, dispositivos cardiovasculares, estruturas de medula óssea, dispositivos para reparo de tendão, guias de nervos, dispositivos de reparo de cartilagem articular, stents, barreiras de adesão e pinos ortopédicos^{180,181}.

5.8 CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE PHA E BLENDS COM PLA

Os filmes dos quatro biopolímeros puros obtidos e em misturas com PLA por evaporação de solvente foram avaliados em relação às propriedades físicas (tensão/deformação), perfilometria óptica e molhabilidade (ângulo de contato).

A Figura 40 mostra a imagem dos filmes obtidos e das blends preparadas com PLA utilizado como referência. Observam-se as diferenças visuais dos filmes de P(3HB) mais duros e quebradiços e com aparência mais rugosa em comparação ao PLA puro. Nas misturas com PLA+P(3HB) e PLA+P(3HBcoHV) pode-se observar que houve pouca miscibilidade entre os dois no preparo dos filmes pelo método de evaporação do solvente.

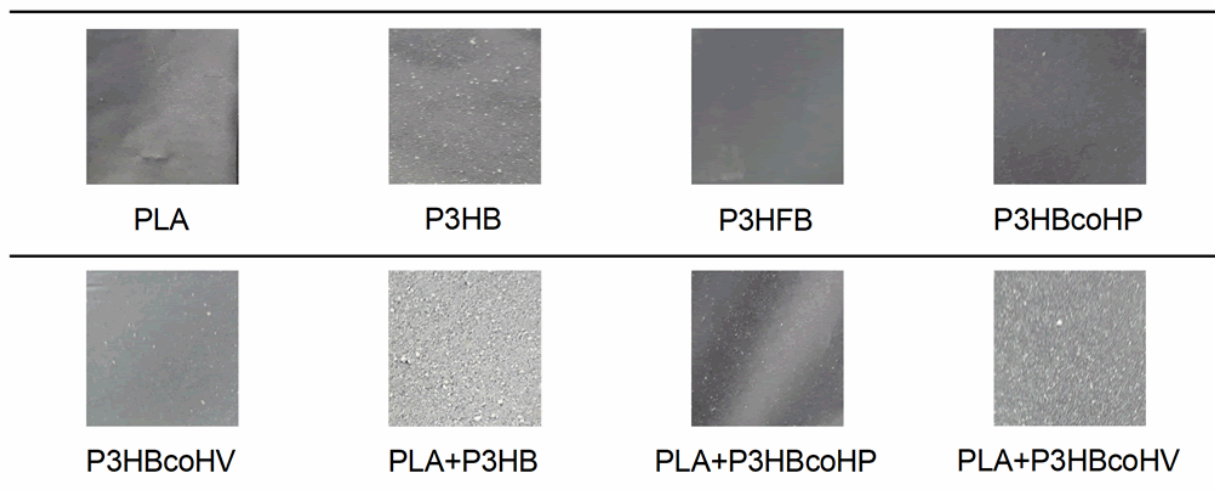


Figura 40 Filmes obtidos dos homopolímeros: PLA, P(3HB), P(3HFB), copolímeros: P(3HBco3HP) e P(3HBco3HV) e em misturas com PLA (1:1)

Os biopolímeros foram solúveis em clorofórmio e 1,2 dicloroetano. Os filmes foram preparados puros e em misturas (50:50) com PLA para os ensaios mecânicos

e de biodegradação. A Figura 41 mostra os resultados dos ensaios de tração dos filmes.

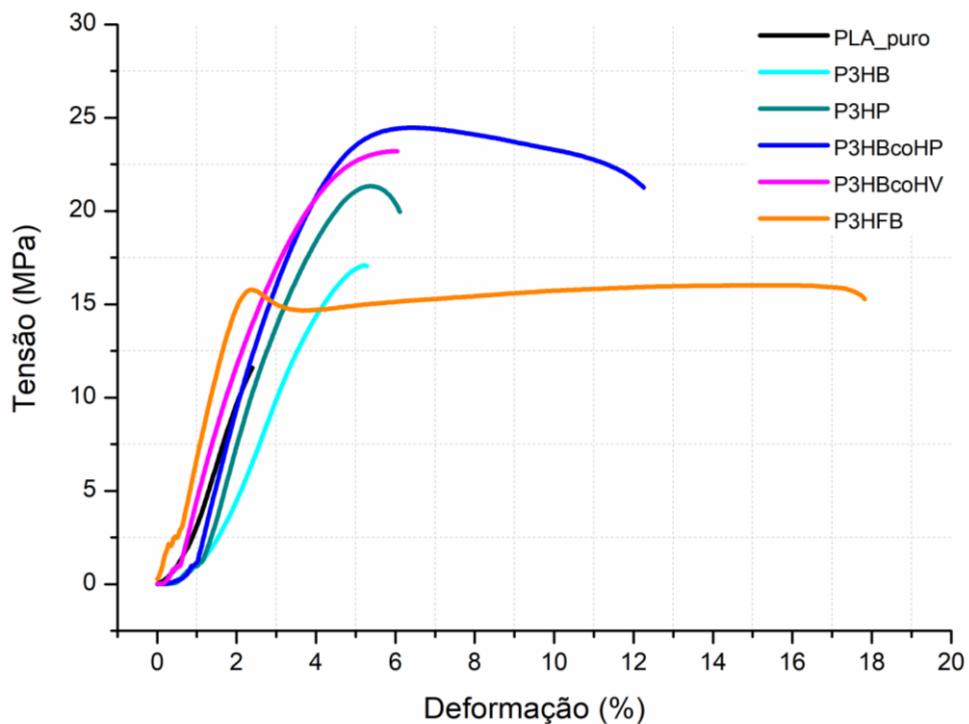


Figura 41 Curvas de tensão versus deformação em ensaios de tração dos biopolímeros puros e PLA comercial

Algumas aplicações de PLA e P(3HB) são consideradas limitadas devido as suas propriedades físicas, apresentando-se como materiais frágeis e com baixa resistência.

Comparando-se os resultados dos ensaios de tensão deformação, observa-se que o filme de PLA sofre ruptura durante a deformação elástica, em $2,0 \pm 0,5\%$ com baixo valor de tensão. Os filmes dos biopolímeros P(3HB), P(3HP) e P(3HBcoHV) suportam uma tensão maior, com ruptura média em $5,5 \pm 0,5\%$.

Os filmes do copolímero P(3HBcoHP) e de P(3HFB) apesar da pouca deformação elástica apresentaram deformação plástica maior com deformação na ruptura de $12 \pm 0,5\%$ e $18 \pm 1\%$, respectivamente. Os resultados são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 Resultados médios dos ensaios mecânicos obtidos dos filmes dos biopolímeros puros e seus desvios padrão

Propriedade / Amostra	PLA	P(3HB)	P(3HP)	P(3HBcoHP)	P(3HBcoHV)	P(3HFB)
Tensão máxima (MPa)	12 ± 1	17 ± 1	20 ± 1	24 ± 0,5	22 ± 1	16 ± 1
Deformação máxima (%)	2,0 ± 0,5	5,0 ± 0,5	5,0 ± 0,5	5,0 ± 0,5	5,0 ± 0,5	2,0 ± 0,5
Tensão na ruptura (MPa)	12 ± 1	17 ± 1	20 ± 1	21 ± 1	23 ± 1	15 ± 1
Deformação na ruptura (%)	2,0 ± 0,5	5,0 ± 0,5	5,5 ± 0,5	12 ± 0,5	6,0 ± 0,5	18 ± 1
Módulo de Elasticidade (GPa)	4,0 ± 0,5	3,0 ± 0,5	4,0 ± 0,5	5,0 ± 0,5	5,0 ± 0,5	6,0 ± 0,5

Vários estudos focaram-se nas misturas de PHA e PLA. Por exemplo, Gerard e Budtova demonstraram através de estudos reológicos que PHA e PLA são polímeros imiscíveis e morfologias descontínuas e nodulares foram observadas. Um exemplo demonstrado foi que apesar do PLA e o P3HBcoHV serem polímeros quebradiços, misturas que contêm uma pequena quantidade de P3HBcoHV em uma matriz de PLA exibiu um aumento significativo da ductibilidade e na deformação plástica. Em geral, P3HBcoHV apresenta cristalinidade e T_m mais baixos e mais propriedades dúcteis do que PHAs de cadeia curta ¹⁸².

Noda e colaboradores ¹⁸³ relataram que as misturas de PLA com este tipo de PHA pode formar um excelente material complementar, que pode equilibrar efetivamente as deficiências desses materiais quando combinados. Por exemplo, os resultados indicaram que a tenacidade e o alongamento na ruptura das misturas melhoraram significativamente quando 10% de PHA foram adicionados ao PLA, o que foi atribuído a um aumento na fase amorfa das misturas e causou excepcionalmente cinética de cristalização lenta de partículas de PHA. Além de PHAs de cadeia curta, mcl-PHAs e PHAs quimicamente modificados também foram relatados para se misturar com PLA para aperfeiçoar suas propriedades físicas ¹⁸⁴.

Os resultados dos ensaios de tensão e deformação das misturas dos PHAs obtidos com PLA são mostrados na Figura 42 e detalhados na Tabela 12.

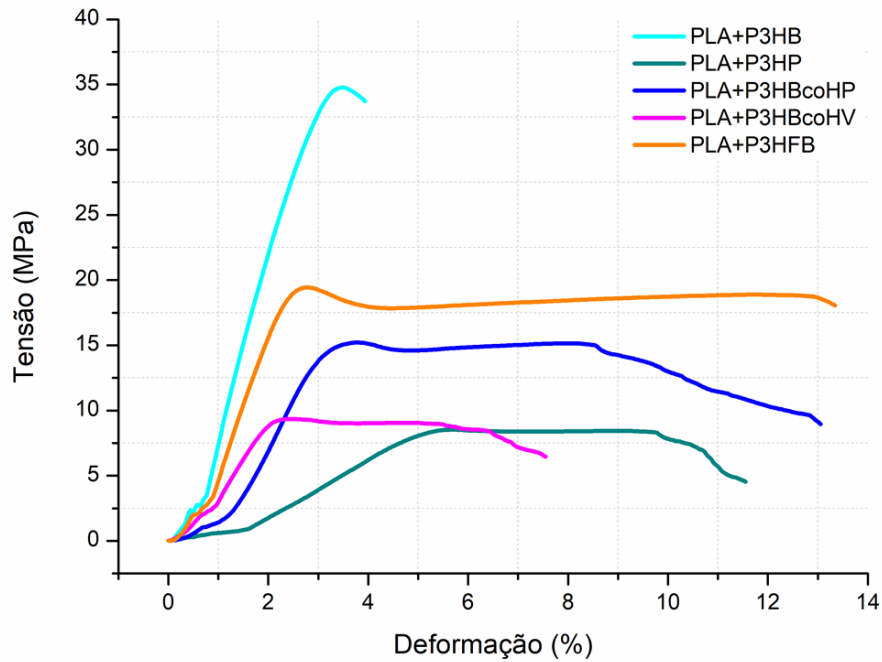


Figura 42 Curvas de tensão *versus* deformação em ensaios de tração dos filmes obtidos da mistura dos PHAs com PLA (50:50)

Todas as blendas obtidas apresentaram maior ductibilidade em comparação ao PLA puro. Observa-se que a blenda obtida da mistura de PLA e P3HB apresentou fragilidade com deformação de ruptura em $4,0 \pm 0,5\%$ porém com maior módulo de elasticidade em comparação com o PLA puro e o dobro de resistência na tensão aplicada (17 MPa). A combinação de PLA com P3HP resultou em um material mais dúctil com aumento da deformação na região plástica e ruptura em $11 \pm 0,5\%$.

Tabela 12 Resultados médios dos ensaios mecânicos obtidos das blendas de PHA e PLA (50:50) e seus desvios padrão

Propriedade / Amostra	PLA +P(3HB)	PLA +P(3HP)	PLA +P(3HBco3HP)	PLA +P(3HBcoHV)	PLA +P(3HFB)
Tensão máxima (MPa)	34 ± 1	$8 \pm 0,5$	16 ± 1	9 ± 1	19 ± 1
Deformação máxima (%)	$3,0 \pm 0,5$	$5,0 \pm 0,5$	$4,0 \pm 0,5$	$2,0 \pm 0,5$	$2,5 \pm 0,5$
Tensão na ruptura (MPa)	34 ± 1	$4 \pm 0,5$	9 ± 1	6 ± 1	18 ± 1
Deformação na ruptura (%)	$4,0 \pm 0,5$	$11 \pm 0,5$	$13,0 \pm 0,2$	$7,0 \pm 0,5$	$13,0 \pm 0,5$
Módulo de Elasticidade (GPa)	$10,0 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,5$	$4,0 \pm 0,5$	$4,0 \pm 0,5$	$7,0 \pm 0,5$

A adição de PLA aos copolímeros P(3HBcoHP) e P(3HBcoHV) aumentou de maneira significativa na comparação do PLA puro e valores de deformação na

ruptura próximos aos obtidos do PHA puro. A adição de PLA no biopolímero P(3HFB) promoveu uma redução de 18% na deformação de ruptura em comparação ao PHA puro, mas muito superior na resistência nas regiões plástica e elástica do PLA puro, mostrando ductibilidade superior em relação às outras blendas.

A Figura 43 (a) e (b) mostra imagens obtidas do filme de P3HB que apresenta uma estrutura nodular com diferentes aglomerações. As imagens de P3HFB na Figura 43 (c) e (d) mostram uma distribuição mais homogênea dos nódulos, porém com espaços maiores.

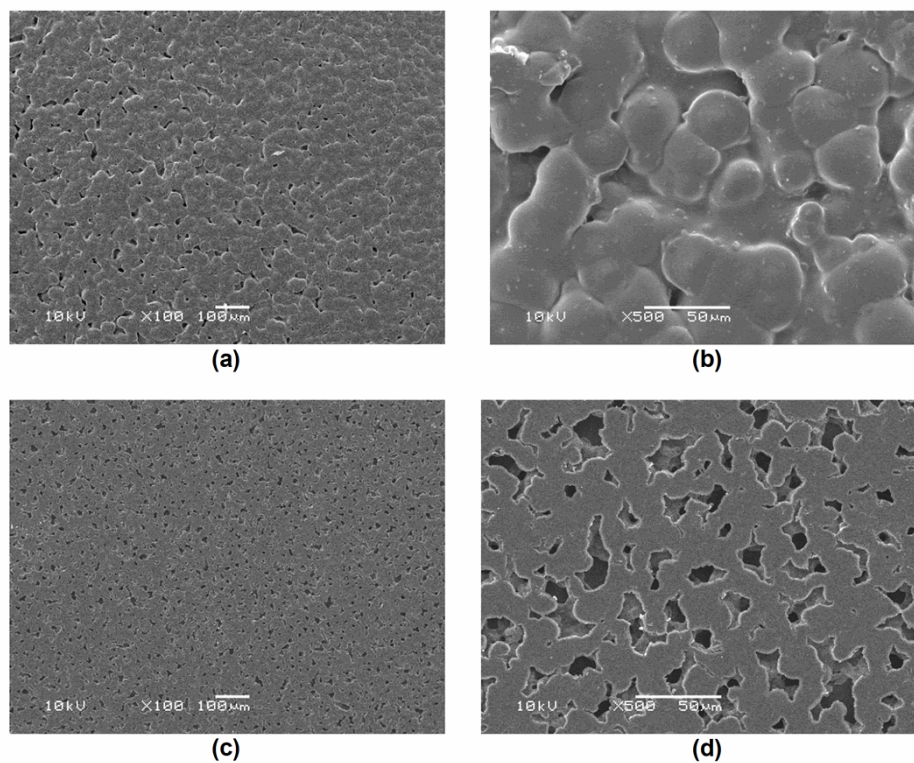


Figura 43 Micrografia dos filmes de P3HB (a) aumento de 100x, (b) aumento de 500x e do filme de P3HFB (c) aumento de 100x e (d) aumento de 500x

Os filmes de PHA foram avaliados por perfilometria óptica e as imagens 2D e 3D obtidas são mostradas na Figura 44.

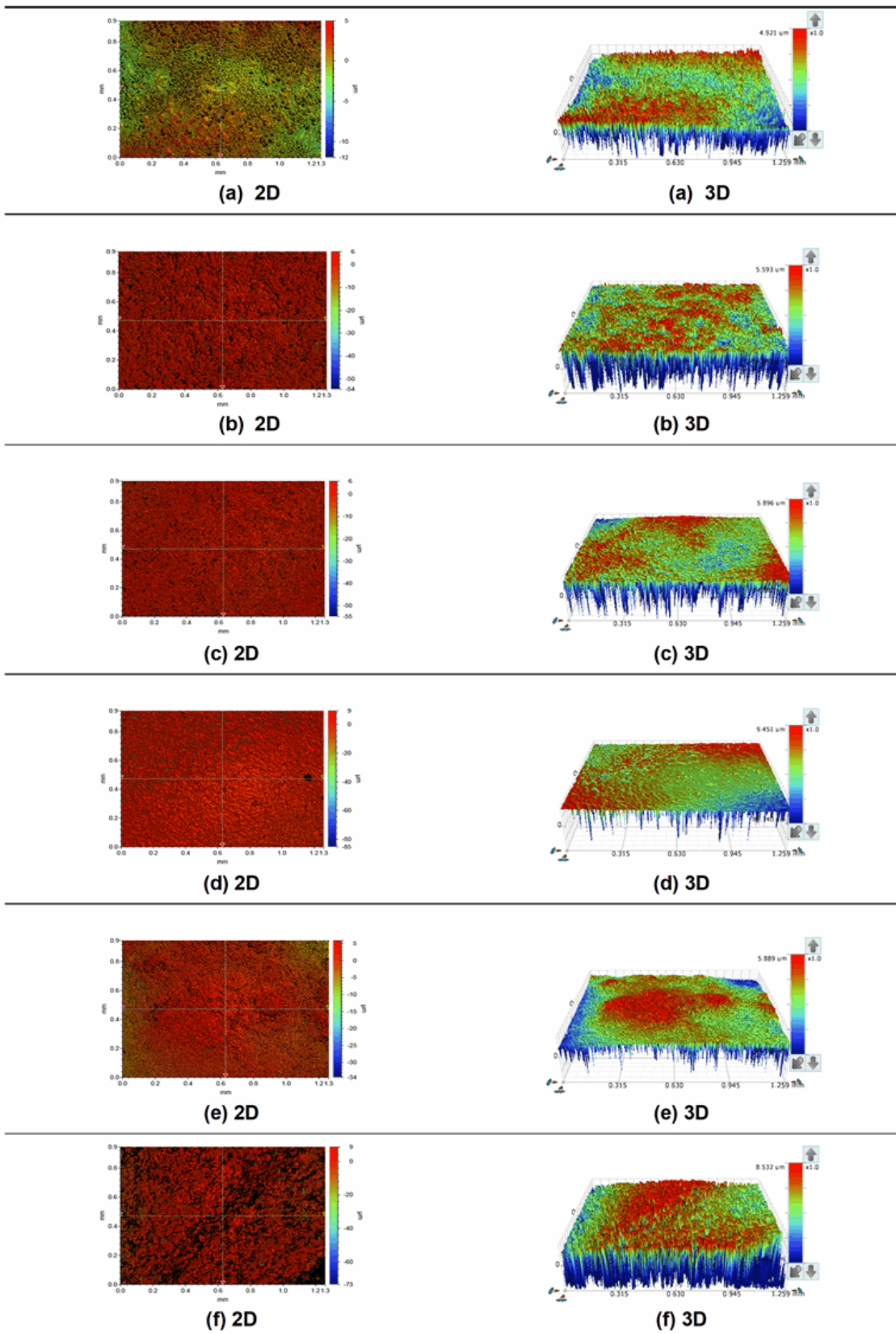
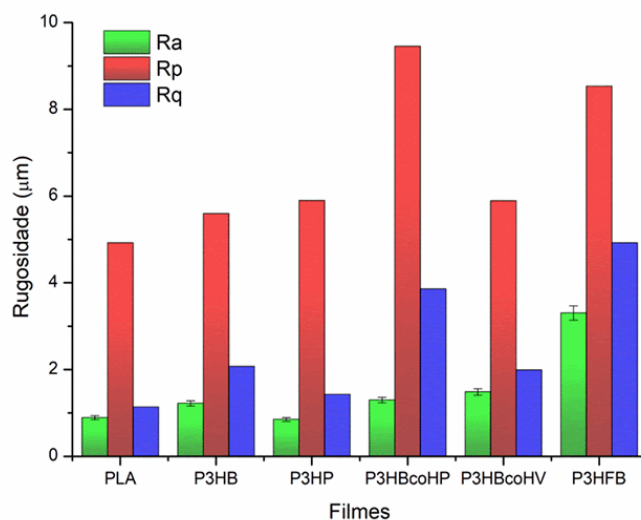


Figura 44 Perfilometria óptica imagens 2D e 3D dos filmes obtidos: (a) PLA, (b) P(3HB), (c) P(3HP), (d) P(3HBcoHP), (e) P(3HBcoHV) e (f) P(3HFB)

A rugosidade da superfície de um filme está relacionada ao tamanho, forma e disposição dos grânulos e imperfeições da amostra. Estas diferenças já foram

observadas nas micrografias entre os filmes de P3HB e P3HFB na Figura 43. Os dados de rugosidade mostrados na Figura 44 e detalhados no gráfico e tabela da Figura 45, mostram que o arranjo das estruturas e organização observadas por nas análises de SAXS influenciaram na rugosidade dos filmes obtidos. Durante a evaporação do solvente algumas estruturas se arranjaram de forma mais compacta e outras que se sobrepuseram em nano clusters.



Filme	Ra (μm)	Rp (μm)	Rq (μm)	Rt (μm)	Rv (μm)
PLA	0,89	4,92	1,13	16,89	-11,97
P3HB	1,22	5,59	2,07	60,78	-54,48
P3HP	0,85	5,90	1,42	60,78	-54,88
P3HBcoHP	1,30	9,45	3,86	94,79	-85,34
P3HBcoHV	1,48	5,89	1,99	40,29	-34,40
P3HFB	3,30	8,53	4,92	81,94	-73,41

Ra: rugosidade média; Rp: média dos picos mais altos; Rq: desvio médio quadrático entre os picos; Rt: altura total do perfil e Rv: ponto mais baixo dos vale

Figura 45 Gráfico e tabela de dados de rugosidade obtidos por perfilometria óptica 2D e 3D dos filmes

Os filmes obtidos dos biopolímeros: P(3HBcoHP), P(3HBcoHV) e P(3HFB) apresentaram maiores valores de Rp que é a média dos picos mais altos. O filme de P(3HFB) também apresentou maior desvio entre picos e vales o que provavelmente influenciou nos resultados de molhabilidade destes filmes.

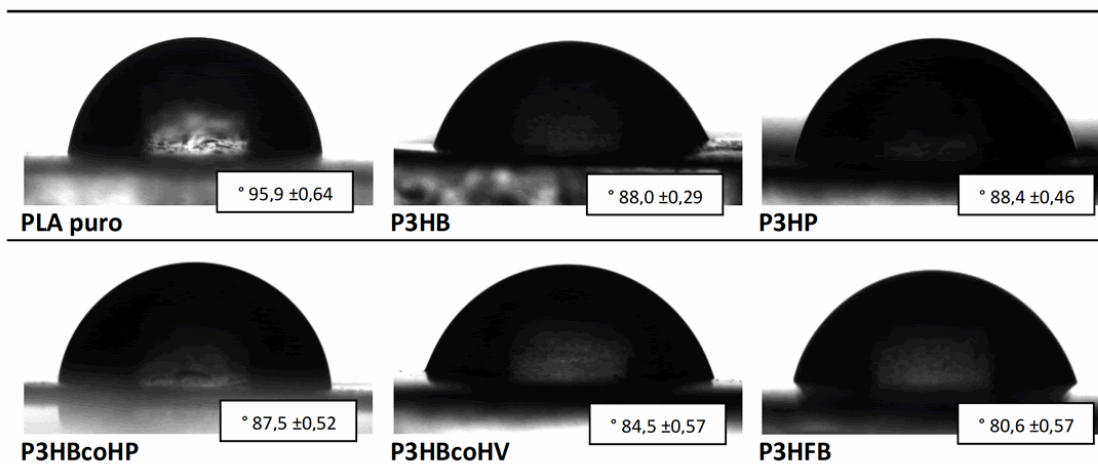


Figura 46 Ângulo de contato dos filmes de PHA ($\theta = 0^\circ$ perfeitamente molhante; $\theta > 90^\circ$ predominantemente não molhante; $\theta < 90^\circ$ predominantemente molhante e $\theta = 180^\circ$ não molhante ¹⁸⁵

O padrão de molhabilidade dos filmes é definido pelo padrão de rugosidade da superfície e afinidade química do filme com a água calculada pelo ângulo de contato. Na Figura 46 é possível observar que o filme de PLA puro ($\theta = 95,9^\circ \pm 0,64$) é predominantemente não molhante, portanto hidrofóbico. Os demais filmes apresentaram ângulos um pouco abaixo de 90° e podem ser considerados como predominantemente molhantes. O filme de P3HFB apresentou o menor ângulo de contato ($\theta = 80,6^\circ \pm 0,57$) entre os filmes, mostrando-se predominantemente molhante, o que corrobora com os resultados das análises de rugosidade destes filmes que favorecem a adesão com a água.

5.9 ENSAIOS DE BIODEGRADAÇÃO DOS FILMES

5.9.1 Ensaio abiótico por intemperismo natural

Amostras dos filmes foram expostas a intempéries por 180 dias para avaliação de resistência à umidade, temperatura, exposição à luz ultravioleta e outros fatores. A Figura 47 mostra o painel de intempéries e a disposição dos filmes durante o ensaio.

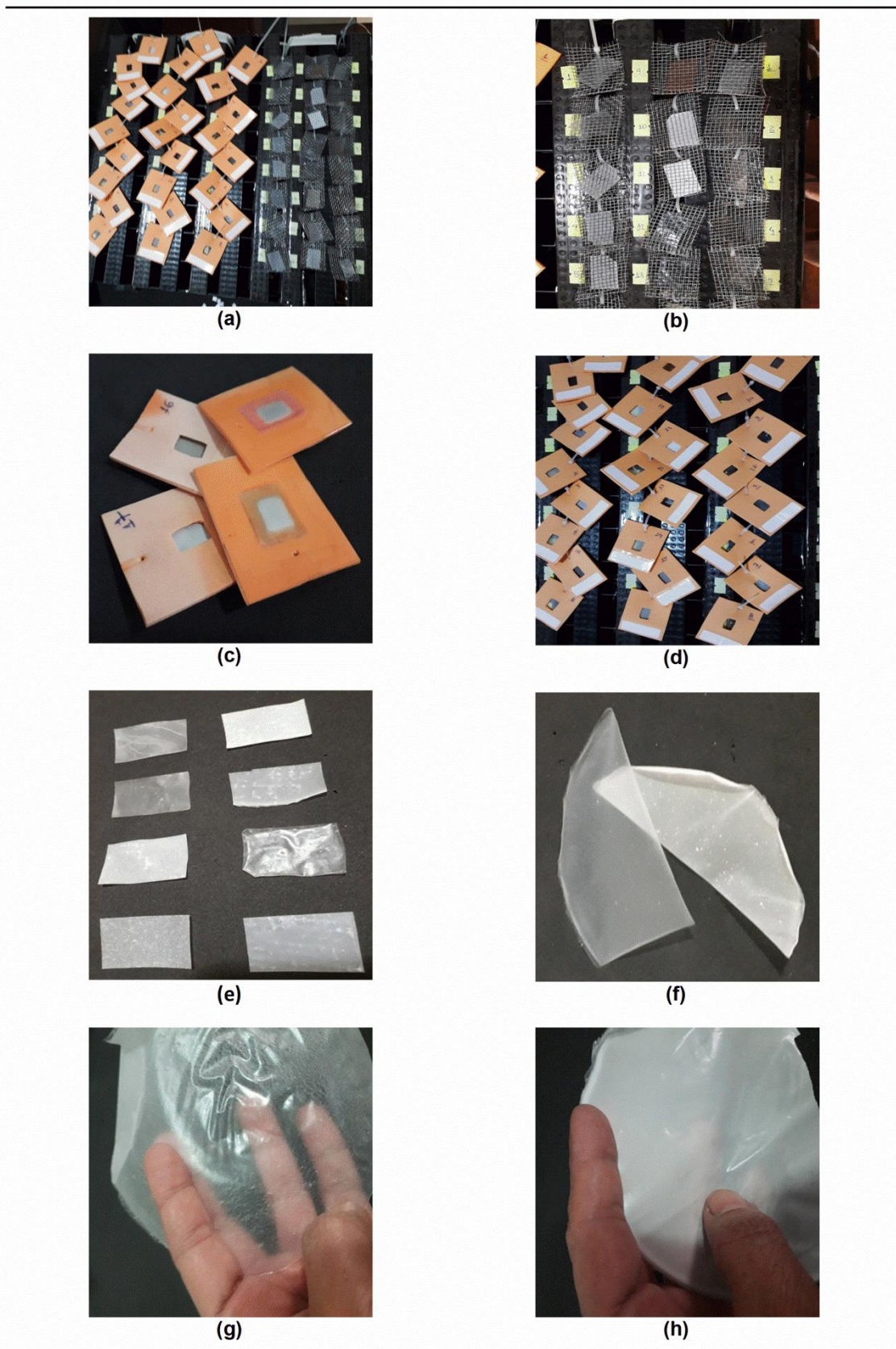


Figura 47 Painel de ensaios de intempéries: (a) Painel completo, (b) Amostras dos filmes em tela de 2 mm, (c) e (d) Suportes preparados para análise em infravermelho, (e) e (f) Amostras padrão dos filmes de PLA e blenda com P3HB, (g) Filme de P3HFB puro e (h) Filme de P3HB puro

A Norma ASTM 1435-13 ⁹² define que não se pode supor que os resultados obtidos a partir da exposição em um único local sejam úteis para determinar a durabilidade do material, são recomendadas exposições em vários locais com climas diferentes para se antecipar a taxa absoluta na qual o material se degrada ou, realizar testes de exposição em equipamentos que simulem intemperismo acelerado. Os resultados dos testes de exposição em curto prazo forneceram uma indicação do desempenho relativo dos filmes ao ar livre.

A Figura 48 mostra micrografias do filme de PLA em diferentes tempos de exposição no painel de intempéries e demonstram resistência em condições normais.

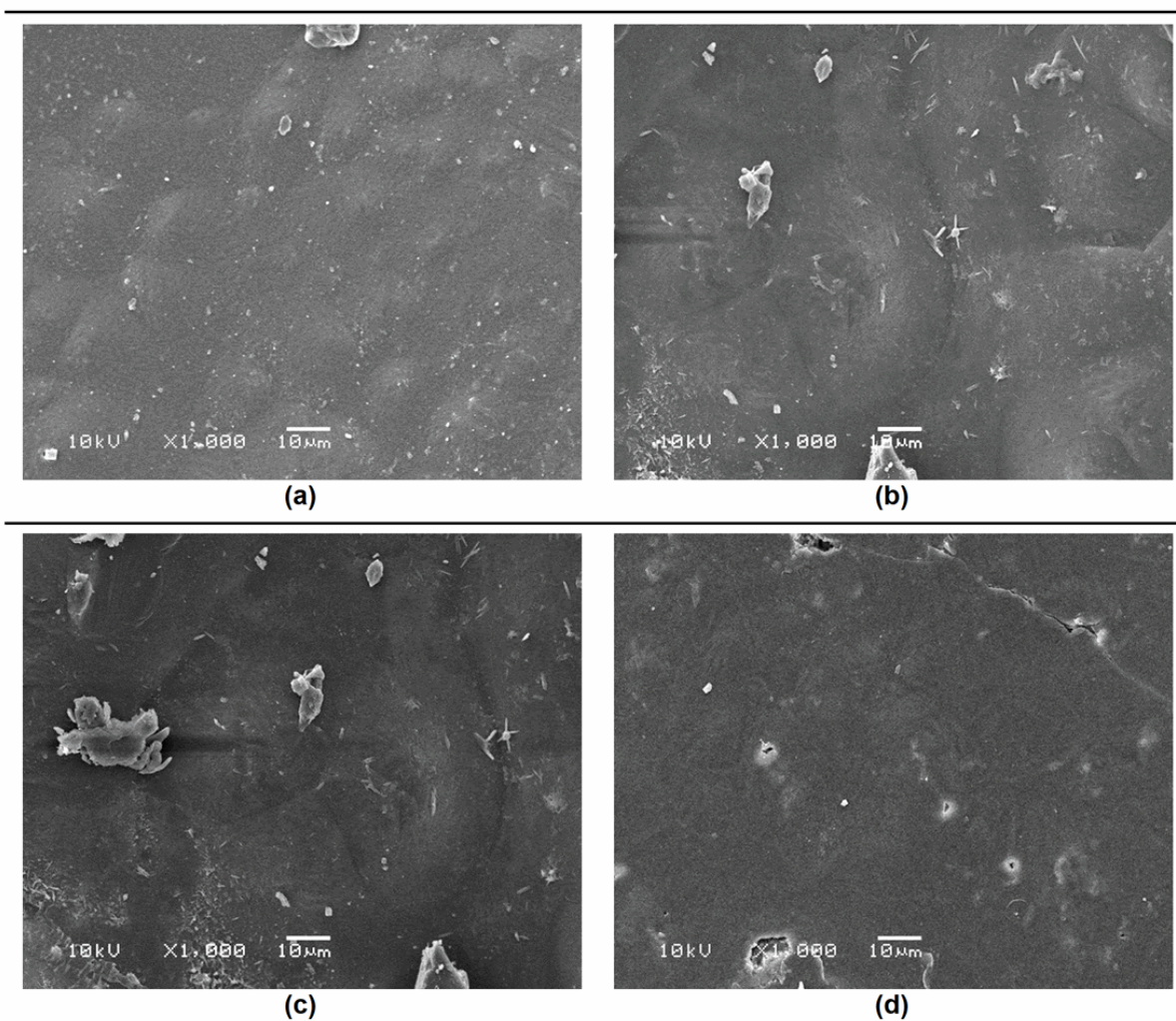


Figura 48 Micrografia do filme de PLA exposto em painel de intempéries: (a) 45 dias; (b) 90 dias; (c) 120 dias e (d) 180 dias

Em condições normais o PLA pode durar por muitos anos. A luz solar não acelera a biodegradação e a luz ultravioleta apenas faz com que o material perca a

cor e fique opaco, o mesmo efeito que ocorre na maioria dos plásticos. No painel de intempéries, amostras de polietileno e polipropileno não sofreram alterações. Na Figura 48 (d) podemos observar apenas pequenas trincas no filme de PLA após 180 dias.

Para monitorar reações de oxidação e fotodegradação dos filmes, pelo método do índice de carbonila (IC) foram realizadas medidas por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). As mudanças na banda de carbonila (C=O), seu deslocamento e alterações entre as regiões amorfas e cristalinas foram calculadas pela deconvolução dos picos na região entre 1800 e 1500 cm^{-1} . Também foram avaliadas visualmente algumas alterações morfológicas como o aumento de porosidade na superfície e alterações na aparência dos filmes como opacidade e ressecamento. Geralmente, a fotodegradação das cadeias poliméricas ocorre na fase amorfa do material, uma vez que é pouco provável que o oxigênio venha difundir nos cristalitos, apesar de ocorrer difusão da luz através destes ⁹⁸. O gráfico da Figura 49 mostra os índices de carbonila obtidos dos filmes antes da exposição no painel de intempéries e após 180 dias.

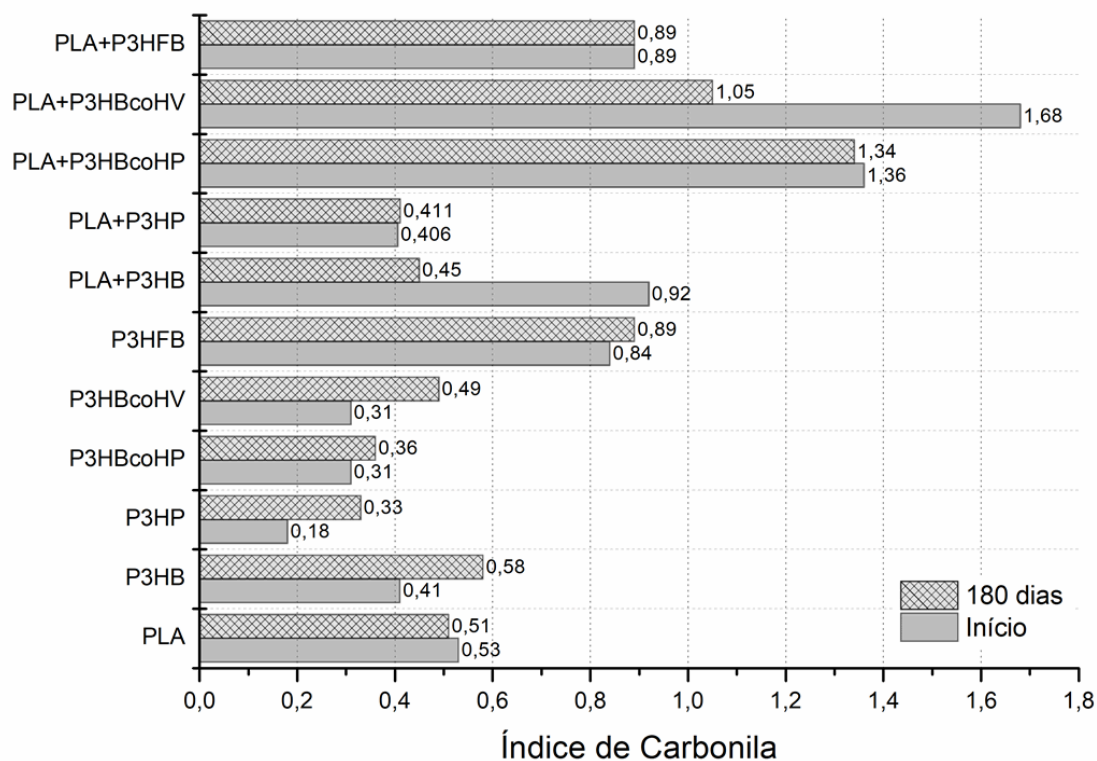


Figura 49 Índice de carbonila (IC) calculado no início do experimento e após 180 dias de exposição a intempéries

As maiores variações e deslocamentos de picos foram observados na região da carbonila entre 1680 e 1750 cm^{-1} nos filmes de: P(3HB) ($\Delta = 40 \text{ cm}^{-1}$), P(3HP) ($\Delta = 18 \text{ cm}^{-1}$), PLA+P(3HB) ($\Delta = 12 \text{ cm}^{-1}$), PLA+P(3HBcoHV) ($\Delta = 9 \text{ cm}^{-1}$), P(3HBcoHV) ($\Delta = 7 \text{ cm}^{-1}$) e P(3HBcoHP) ($\Delta = 5 \text{ cm}^{-1}$). Os filmes de PLA, P(3HFB) e as blendas: PLA+P(3HP), PLA+P(3HBcoHP) e PLA+P(3HFB) apresentaram deslocamentos abaixo de 4 cm^{-1} . Das relações dos índices de carbonila (IC) calculados após 180 dias de exposição no painel de intempéries observou-se que o aumento de IC corresponde à redução da região amorfa e a redução do IC ao aumento da área na região amorfa ⁹⁸. A fração menos cristalina tende a sofrer maior fotodegradação em comparação ao material mais cristalino como o PLA e foi observado nos filmes com menor cristalinidade calculada: P(3HFB) (14%), P(3HBcoHV) (23,5%), P(3HBcoHP) (23,1%), P(3HP) (24,8%) e P(3HB) (34,1%). O inverso foi observado com aumento na região amorfa e consequente redução do IC nos filmes: PLA (58%), PLA+P(3HB) (48%) e PLA+P(3HBcoHV) (51,3%). Os índices de carbonila não apresentaram variações nas blendas: PLA+P(3HP), PLA+P(3HBcoHP) e PLA+P(3HFB), estes filmes também apresentaram as maiores deformações na região plástica antes da ruptura com ($11 \pm 0,5\%$), ($13 \pm 0,2\%$) e ($13 \pm 0,5\%$), respectivamente. No caso de polímeros biodegradáveis, há um aumento do índice de carbonila, seguido por uma diminuição subsequente causada pela biodegradação. A maior redução do IC foi observada através das curvas de deconvolução do filme de PLA+P(3HBcoHV) de 1,68 para 1,05 e pode ser visto nos gráficos da Figura 50.

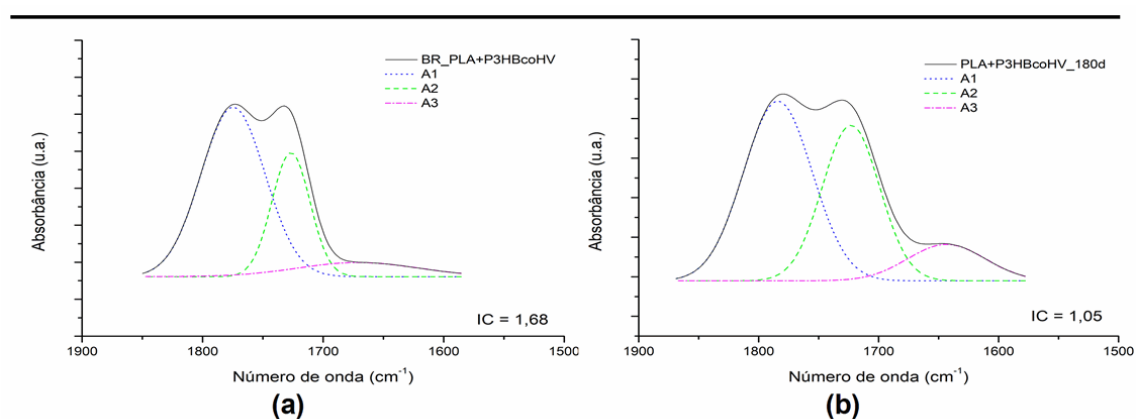


Figura 50 Deconvolução do espectro de infravermelho das regiões de carbonila das amostras de PLA+P(3HBcoHV): (a) antes da exposição às intempéries e (b) após 180 dias de exposição às intempéries

Os espectros obtidos por FTIR e deconvoluções de todos os filmes são mostrados no Apêndice D. Materiais poliméricos quando são expostos às intempéries, como radiação solar, absorção da radiação na região do ultravioleta geralmente perdem resistência mecânica, brilho, transparência e apresentam fissuras dos filmes ¹⁸⁶. Durante os ensaios as variações climáticas foram típicas do período conforme dados registrados pela estação automática de Porto Alegre (INMET) com temperaturas máximas registradas entre novembro/2018 até início de março/2019 com picos próximos a 35°C. Baixa umidade do ar foi registrada mantendo-se abaixo de 60% na maior parte do período de novembro/2018 a fevereiro/2019. A radiação solar mais intensa em novembro e dezembro/2018 (4K) ficou estável no período entre janeiro/2019 até o final dos ensaios em maio/2019. Os dados climáticos do período são mostrados no Anexo IV.

5.9.2 Ensaio de biodegradação em meio aquoso (mgCO₂)

A Figura 51 mostra os gráficos obtidos dos ensaios de produção acumulada de CO₂ e o percentual de perda de massa dos filmes após 120 dias de incubação.

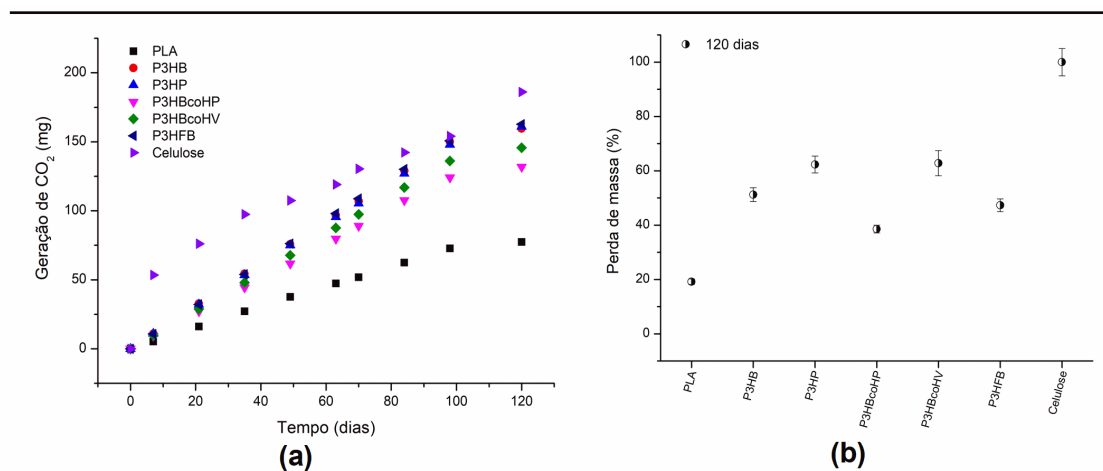


Figura 51 Biodegradação em meio líquido em 120 dias: (a) Produção acumulada de CO₂ (mg) e (b) Perda de massa (%) dos filmes

As fibras de celulose apresentaram 100% de perda de massa gerando no acumulado em torno de 186,1 mg de CO₂. Os filmes de PHA acumularam valores de CO₂ entre 131,8 e 162,7 mg. No entanto, as maiores perdas de massa percentuais foram das amostras de P3HP e P3HBcoHV. Na comparação com o filme de PLA (perda de massa ~ 19,2% e 77,4 mg CO₂), os resultados dos filmes de PHA foram considerados satisfatórios.

5.9.3 Ensaio de biodegradação em solo



Figura 52 (a) Porta amostra de tela em inox (1mm); (b) Estufa; (c) e (d) amostras em triplicata; Amostras dos filmes após 45 dias: (e) PLA; (f) P(3HB); (g) PLA+P(3HP); (h) PLA+P(3HBcoHP); (i) P(3HBcoHV) e (j) PLA+P(3HFB)

A decomposição dos filmes foi avaliada com a pesagem dos filmes nos intervalos definidos: 45, 90, 120, 150 e 180 dias mostrados no gráfico da Figura 53

(a). O filme de PLA e de celulose pura foram considerados como referência para comparação. O grau de degradação dos filmes em percentual foi determinado após 180 dias peneirando a matriz final através de uma peneira de 2 mm, a fim de recuperar os resíduos não desintegrados que correspondem ao percentual de massa final do filme não biodegradado, Figura 53 (b).

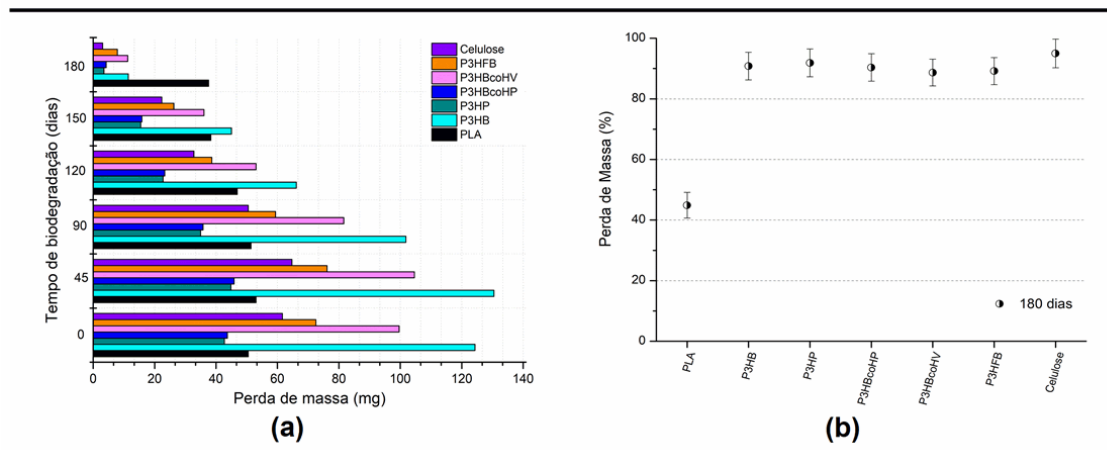


Figura 53 Biodegradação dos filmes de PHA, PLA e Celulose (a) Perda de massa (mg) em ensaio de biodegradação em solo com amostragem em: 45, 90, 120, 150 e 180 dias; (b) Percentual médio de massa biodegradada em 180 dias

Nos primeiros 45 dias observa-se um pequeno aumento da massa dos filmes provavelmente por intumescimento das fibras pela umidade ou presença de microrganismos na superfície. A perda de massa foi observada de forma gradual em todos os filmes e muito similares para o P(3HP) e P(3HBcoHP) que após 180 dias degradaram 91,9 e 90,4%, respectivamente. Os demais filmes alcançaram resultados entre 89 e 91%. Na comparação com a celulose (95%) estes resultados foram satisfatórios.

Uma das condições da Norma NBR 15448-2 é que menos de 10% da massa seca original deve ficar retida em malha de 2 mm após 12 semanas de teste. O PLA leva muito mais tempo para se degradar em temperatura e pressão ambiente e degradou em torno de 45% durante os ensaios. Informações do fabricante indicam temperaturas próximas de 100 °C como condições de compostagem ideais para alcançar cerca de 90% de degradação ¹⁸⁷.

Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da biodegradação dos filmes de P3HB é mostrado na Figura 54.

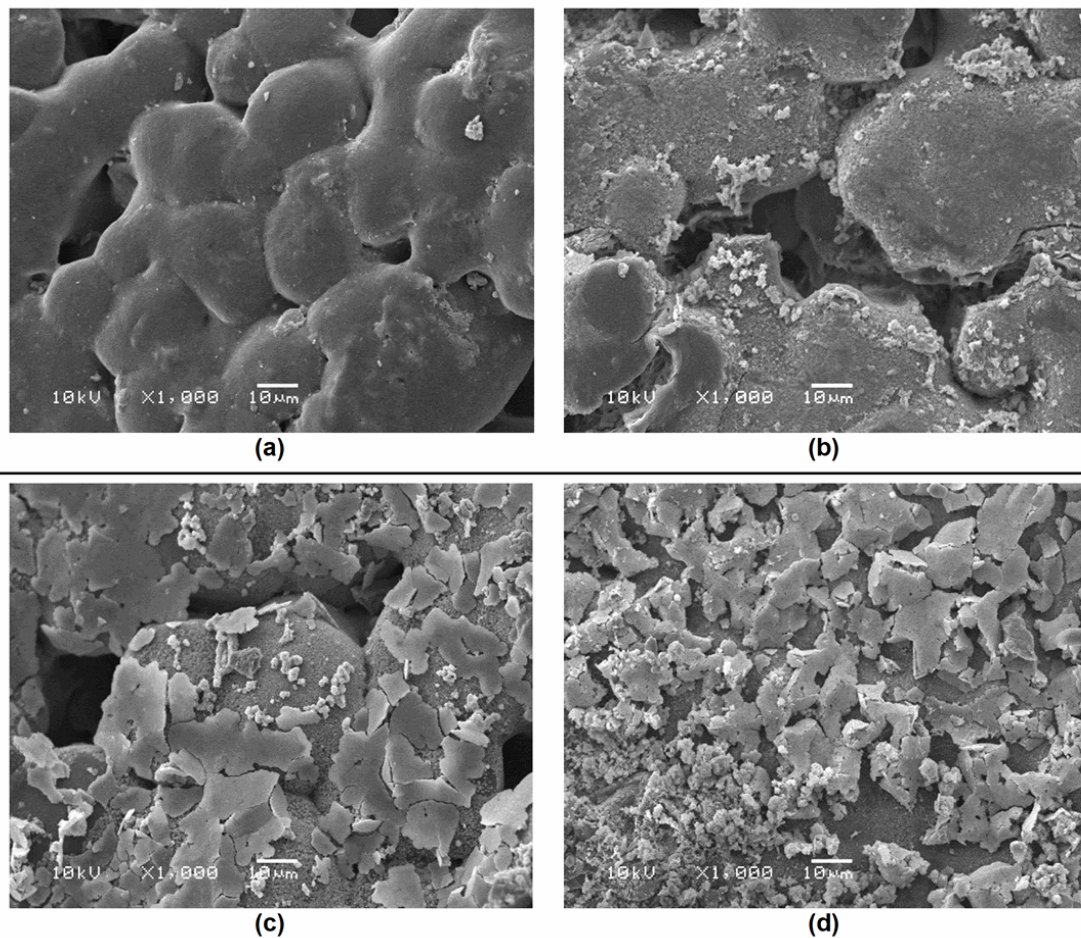


Figura 54 Micrografia dos filmes de P3HB em biodegradação no solo: (a) 45 dias; (b) 90 dias; (c) 120 dias e (d) 180 dias

A Figura 54 mostra as diferentes etapas da biodegradação dos filmes de P(3HB) que apresenta fragmentação em camadas nos diferentes tempos gerando fragmentos menores que 2 mm em 180 dias. Durante este período observou-se mudanças visuais na superfície dos filmes com aumento das irregularidades e rigidez ao toque.

O padrão de biodegradação dos filmes de P3HBcoHV e P3HFB analisado por microscopia apresentou aspectos diferentes do P3HB com a observação da presença de erosões mais profundas na superfície. Estes biopolímeros, que apresentaram maior rugosidade superficial média (R_a), 1,48 e 3,30, respectivamente, provavelmente facilitou a adesão e ação dos microrganismos na superfície. Estes filmes apresentaram os menores valores nos ensaios de ângulo de contato demonstrando ser predominantemente molhantes. As micrografias são mostradas na Figura 55.

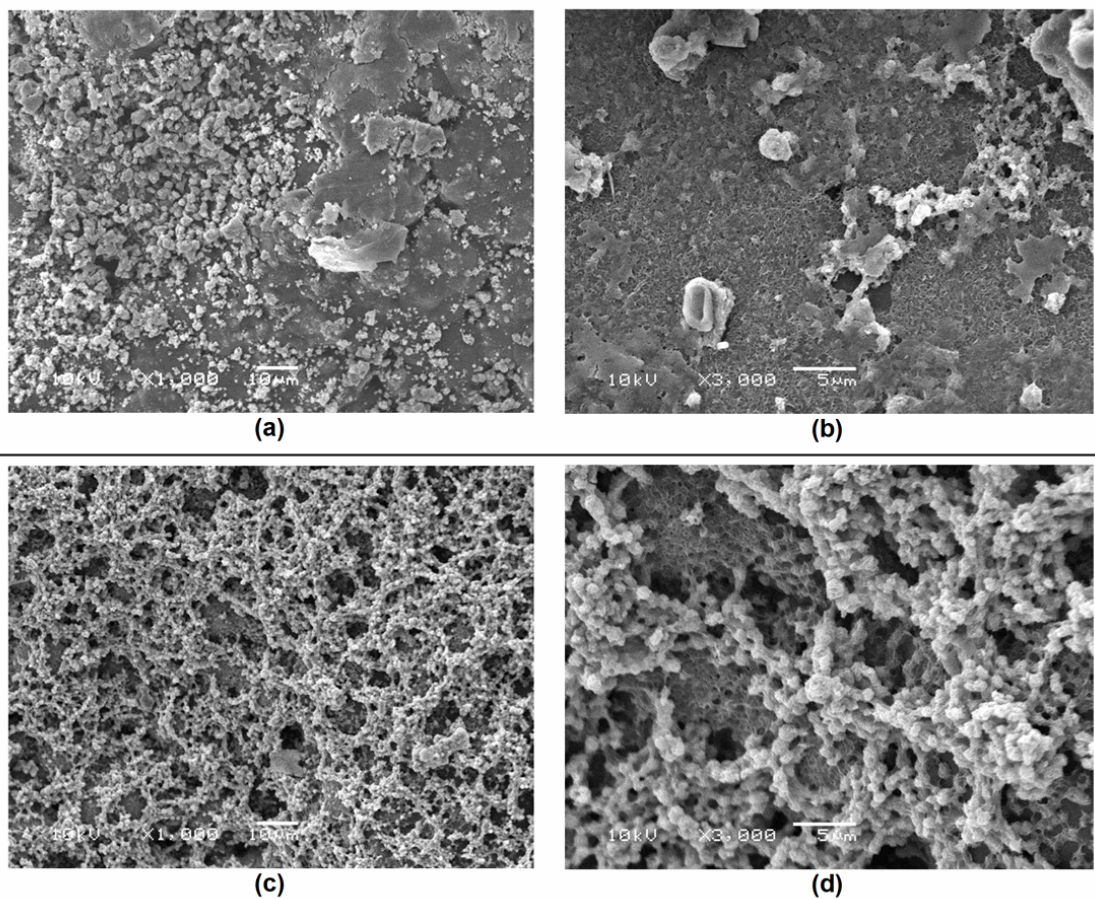


Figura 55 Micrografias obtidas por MEV após 180 dias da biodegradação em solo de fragmentos dos filmes de PHA: (a) P(3HBcoHV) (1000x), (b) P(3HBcoHV) (3000x), (c) P(3HFB) (1000x) e (d) P(3HFB) (3000x)

Como observado anteriormente, a degradação dos filmes de P(3HP) e do copolímero P(3HBcoHP) apresentaram perda de massa similar durante o ensaio de biodegradação. A análise por microscopia eletrônica de varredura sugere a presença de fungos na superfície dos filmes de forma homogênea, assim como o comprometimento de toda superfície. As imagens comparativas são mostradas na Figura 56.

A norma antecipa que embora os pontos finais da biodegradação incluam a incorporação em biomassa ou substâncias húmicas, bem como dióxido de carbono, não existem métodos de teste padrão reconhecidos e especificações para quantificar esses resultados.

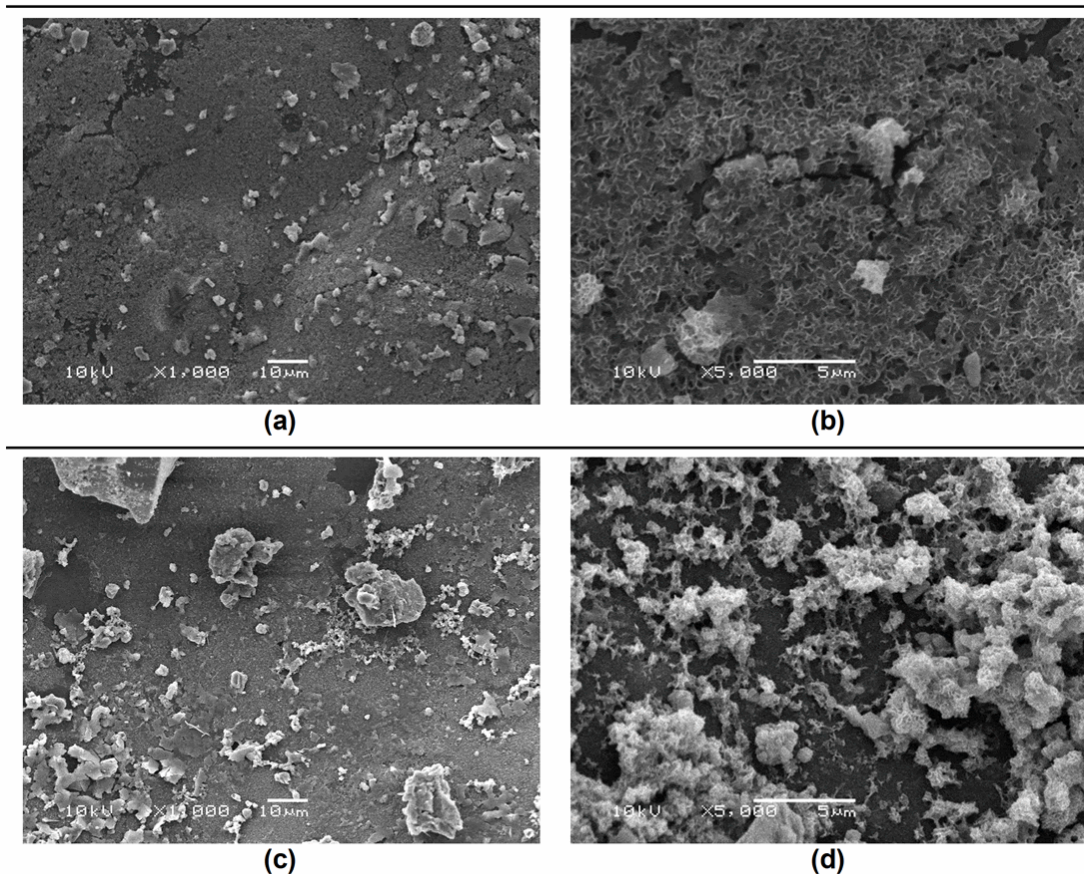


Figura 56 Micrografias obtidas por MEV do padrão de biodegradação dos filmes de PHA: (a) P(3HBcoHP) (1000x), (b) P(3HBcoHP) (3000x), (c) P(3HP) (1000x) e (d) P(3HP) (3000x)

Os resultados das blendas foram mais satisfatórios em comparação ao PLA puro e similar ao PHA puro. Os gráficos de perda de massa e percentual degradado são mostrados na Figura 57.

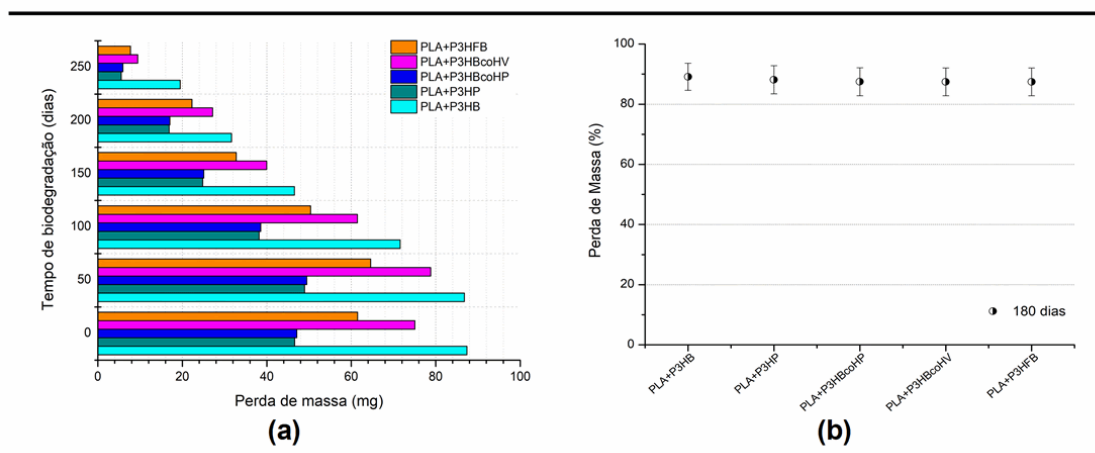


Figura 57 Biodegradação das blendas de PHA e PLA (50:50): (a) Perda de massa (mg) em solo com amostragem em: 45, 90, 120, 150 e 180 dias; (b) Percentual médio de massa biodegradada em 180 dias

5.9.4 Avaliação de toxicidade no crescimento e germinação de sementes

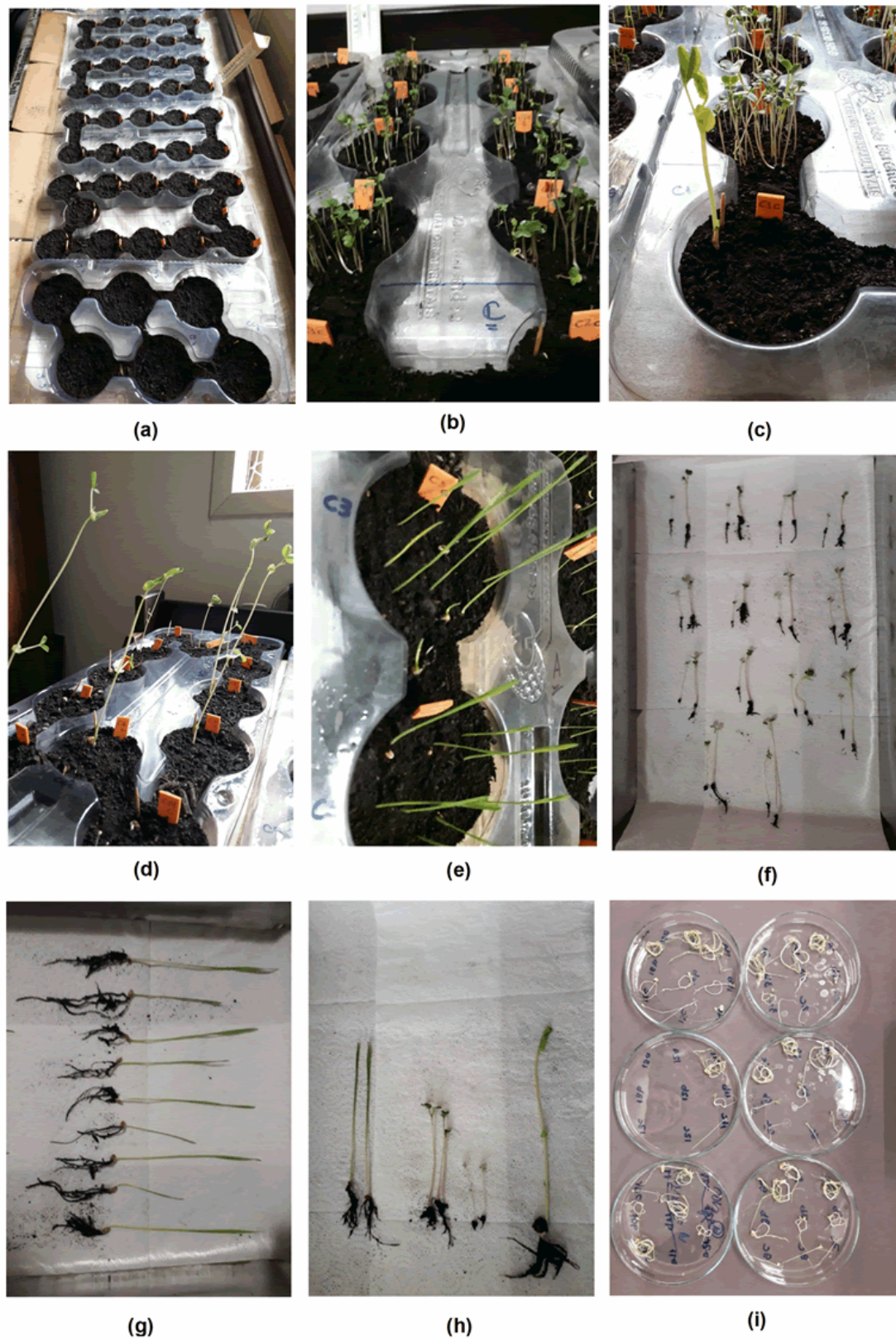


Figura 58 (a) Bandejas do ensaio de germinação; (b) e (c) Início da germinação de sementes de Mostarda; (d) Ervilha com 21 dias; (e) Trigo com 21 dias; (f), (g) e (h) medições das amostras em triplicata e (i) secagem final para avaliação de biomassa

A Figura 58 mostra algumas imagens obtidas durante os experimentos de germinação, medição e pesagem das amostras para avaliação do acúmulo de biomassa.

Conforme descrito no item (4.24.4) da metodologia, para que o teste seja considerado válido conforme os critérios da norma OECD 208 ⁹⁹: a taxa de germinação e a biomassa vegetal dos compostos da amostra não devem ser inferiores a 90% na comparação com as amostras de controle para as duas espécies de plantas selecionadas. A emergência de mudas deve ser no mínimo de 80% para as culturas e 65% para não agrícolas, tanto as mudas como os controles não devem exibir efeitos fitotóxicos visíveis (ex: clorose, necrose, murchamento, deformações da folha e do caule, etc.) e a sobrevivência média do controle foi 100% durante o estudo.

Os dados obtidos da germinação preencheram todos os requisitos da norma e as maiores diferenças foram observadas na biomassa final: para as monocotiledôneas nos cultivos de trigo com as misturas de: PLA+P(3HP) e PLA+P(3HBcoHP) com aumento da biomassa entre 20 e 38%, e no cultivo de rabanete em média 15%. No cultivo de trigo com resíduos dos PHAs puros: P3HB e P(3HFB) observaram-se aumento de biomassa de 14 e 21%, respectivamente. O tamanho das plantas e raízes foi similar ao do controle. Os resultados médios das triplicatas para o cultivo de monocotiledôneas, trigo e rabanete, são mostrados na Figura 59.

Nos cultivos com dicotiledôneas, as mudas de ervilha torta desenvolveram plantas maiores que as do controle em todos os cultivos e conseqüentemente, um acúmulo de biomassa final maior variando de 20 a 40%. Os maiores acúmulos ocorreram nas misturas do solo com P(3HP) e P(3HBcoHP). As mudas de mostarda crepsa desenvolveram raízes menores do que o controle e acúmulo de biomassa maior nos cultivos da mistura de solo com P(3HP) e PLA+P(3HP) em torno de 18%. Os resultados médios das triplicatas para o cultivo de dicotiledôneas, ervilha torta e mostarda, são mostrados na Figura 60.

Com estes resultados podemos concluir que a presença dos PHAs nas misturas com solo desenvolveram todos os cultivos de maneira satisfatória. Não foram observados efeitos fitotóxicos nas plantas e todas as mudas resistiram vários dias após o término do experimento.

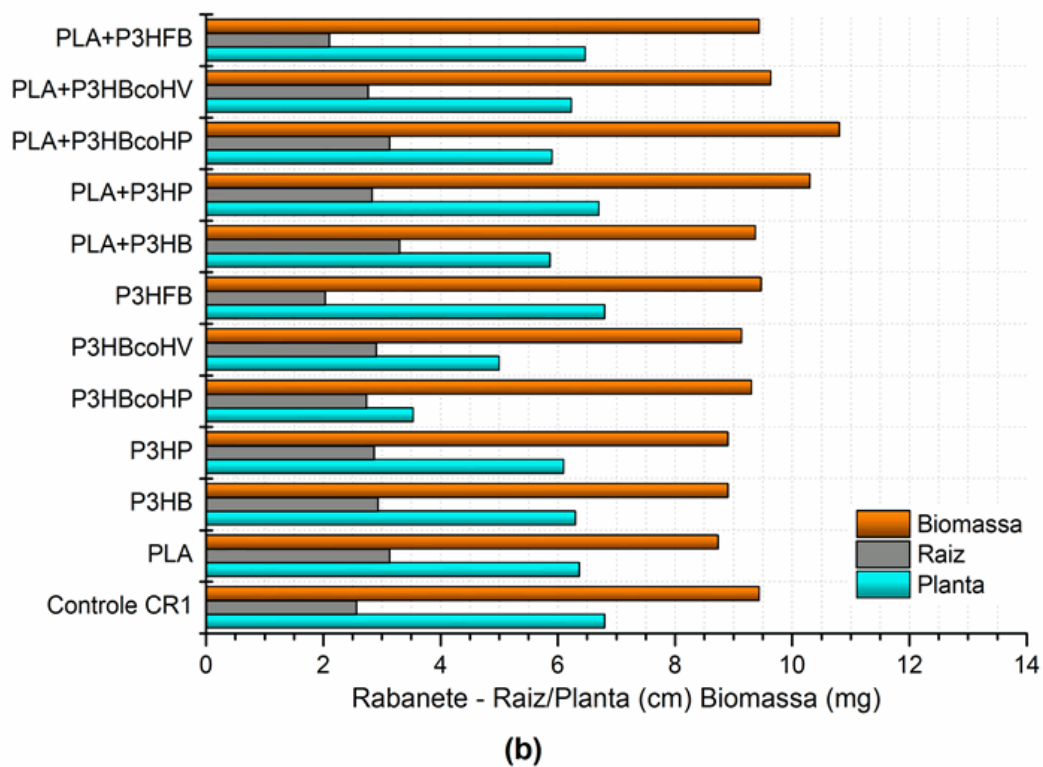
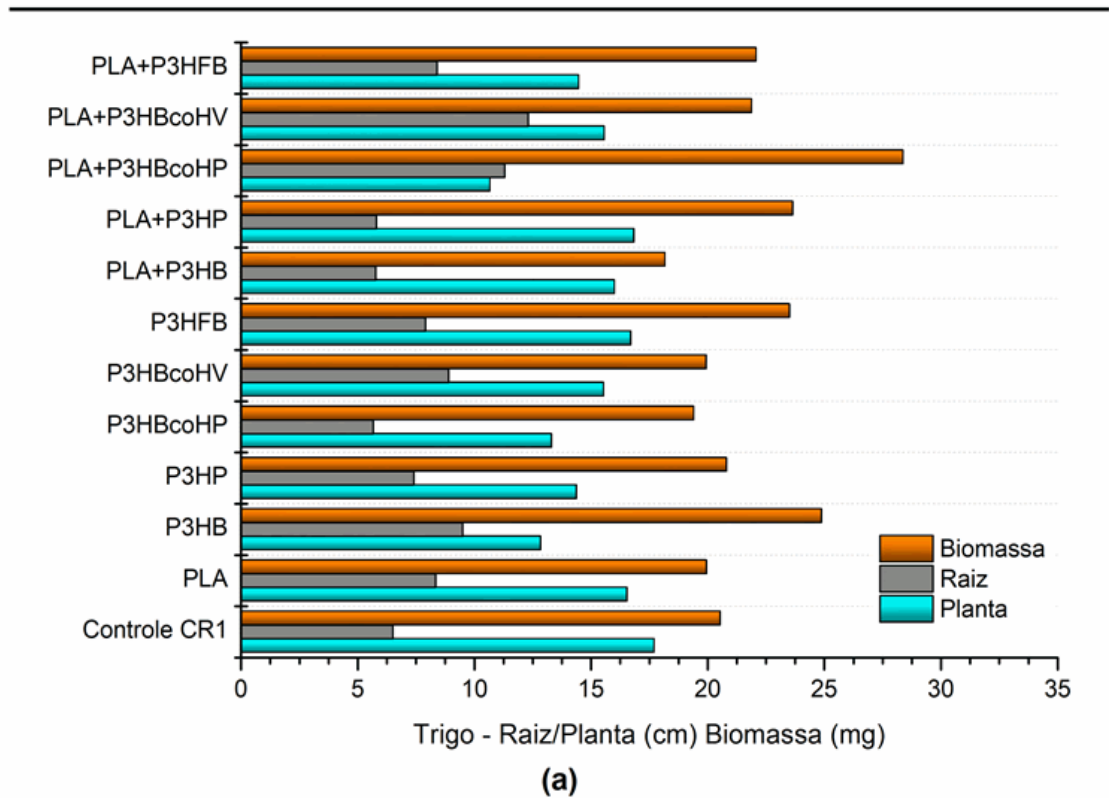


Figura 59 Desenvolvimento dos espécimes de monocotiledônea cultivados indicando medições da planta e raiz (cm) e de biomassa (mg): (a) Trigo (b) Rabanete

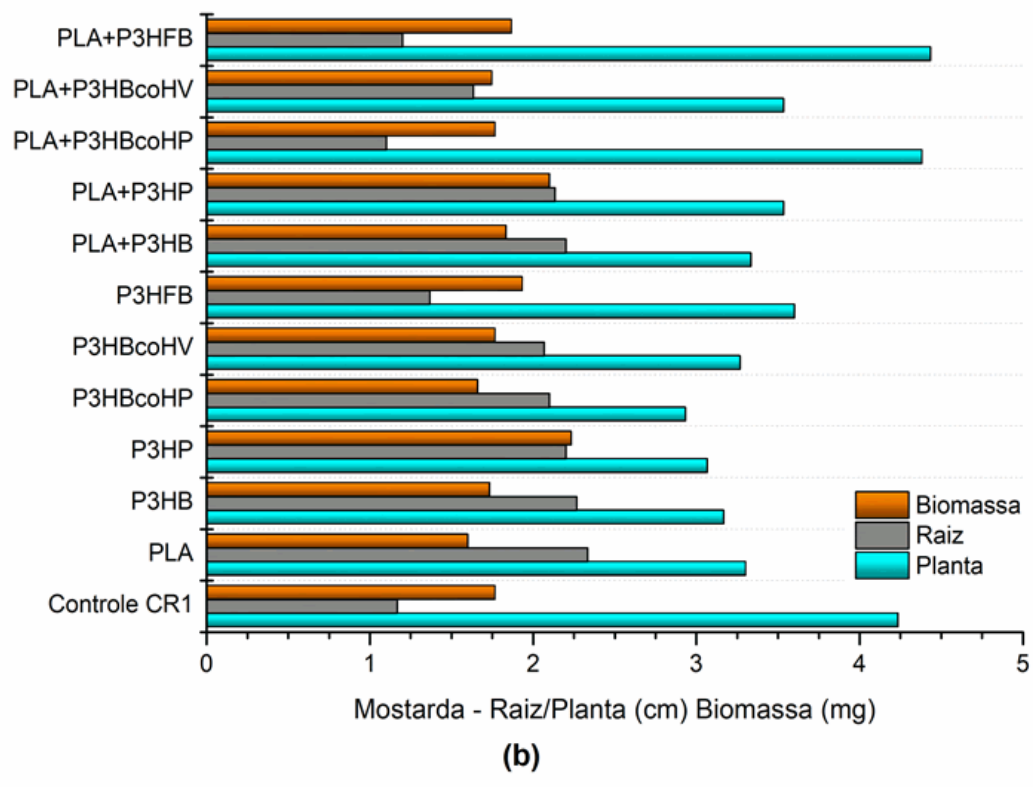
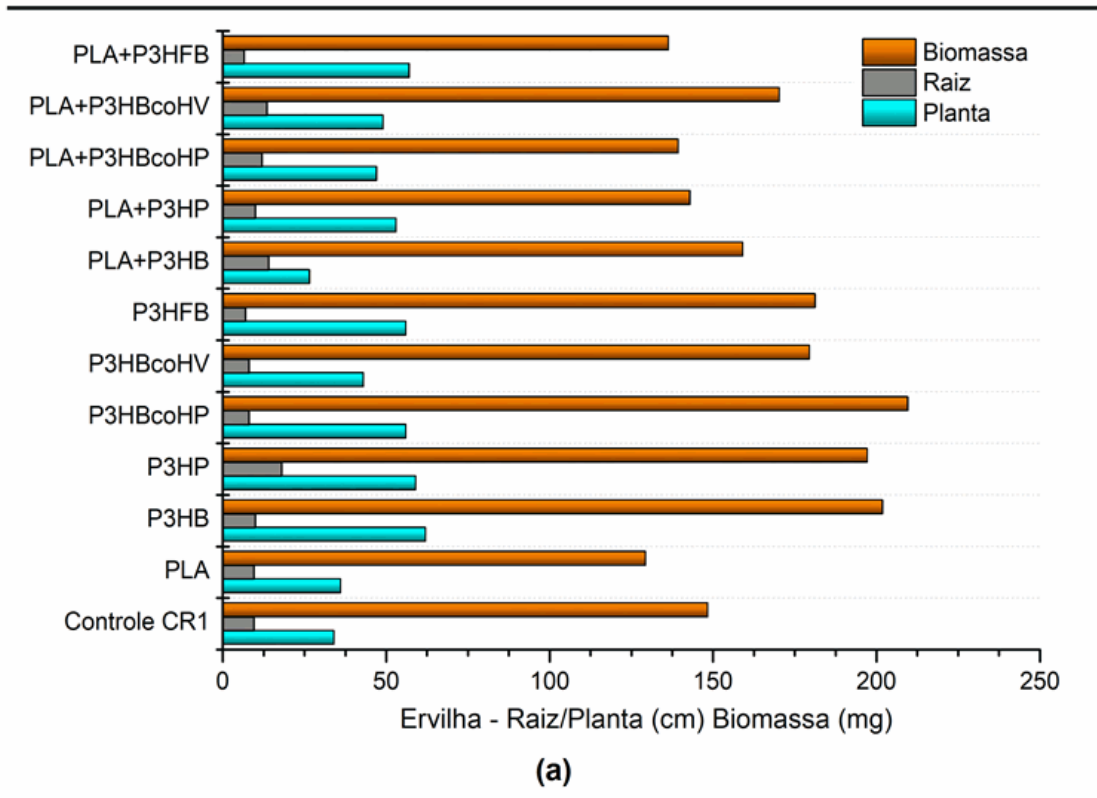


Figura 60 Desenvolvimento dos espécimes de dicotiledônea cultivados indicando medições da planta e raiz (cm) e de biomassa (mg): (a) Ervilha torta (b) Mostarda crespa

6 POTENCIAL APLICAÇÃO BIOECONÔMICA

Com os resultados apresentados durante esta investigação, buscamos avaliar a viabilidade do processo desenvolvido e sua possível inserção no mercado do agronegócio e potencial aplicação bioeconômica. O agronegócio brasileiro é responsável por grande parte da economia do país, representando cerca de 21% do Produto Interno Bruto (PIB) e por metade das exportações, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento ¹⁸⁸.

A inserção estratégica e competitiva da Bioeconomia brasileira no contexto mundial é um dos eixos de impacto do VI Plano Diretor da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) e é tema de importância central em um mundo cada vez mais pautado pela busca do desenvolvimento sustentável. Baseada no uso intensivo de novos conhecimentos científicos e tecnológicos, gerados a partir de áreas de ponta como a biotecnologia industrial, química de renováveis, nanotecnologia, entre outras, o potencial da bioeconomia não se restringe à produção de bioenergia e envolve também a produção de plásticos biodegradáveis, biopolímeros, biopesticidas, pigmentos, alimentos funcionais, medicamentos, fragrâncias e cosméticos ¹⁸⁹.

O Brasil mostra que possui vantagens comparativas e competitivas para avançar nas pesquisas relacionadas à bioeconomia. O país possui culturas agrícolas de grande extensão, intensa radiação solar, água em abundância, ampla biodiversidade e diversidade de clima. Estes fatores auxiliam no desenvolvimento do Brasil nestas áreas, e também atrai a atenção de investidores estrangeiros para a implementação de projetos inovadores, baseados em novas tecnologias, e visando o desenvolvimento de novos produtos. Um fator que gera bastante debate (em relação ao desenvolvimento sustentável) é a grande geração de resíduos do setor agrícola que apresentam dificuldade de transporte, acumulando matéria-prima sem valor que pode ocasionar problemas ambientais, como gases que contribuem para o aquecimento global ¹⁹⁰.

Desta forma, acreditamos na importância econômica, social e ambiental que poderia ser desenvolvida a partir deste estudo e, com o apoio do setor de gestão estratégica do INCT-Midas (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Midas, UFMG) foi desenvolvido um modelo de negócios para uma Startup que opere

diretamente nas unidades geradoras dos resíduos agroindustriais, sem a necessidade de transporte da matéria-prima.

O produto que poderá ser comercializado na forma de pellets ou em pó apresenta todas as vantagens competitivas em relação aos maiores concorrentes no mercado atual, e durante a validação do modelo de negócios destacamos o custo de produção 60% menor que o líder de mercado e o fato de não necessitar compostagem após seu ciclo de utilização.

O mercado de bioplásticos cresceu 15% ao ano nos últimos três anos e a projeção até 2021 é que sejam produzidos 9,2 milhões de toneladas de plásticos biodegradáveis. Nosso produto está inserido em 18% da produção disponível hoje no mercado o que o torna interessante para investidores, com um faturamento que pode gerar U\$ 64 milhões ao ano*.

A Startup *Innove Blend* apresentou um modelo de negócios repetível e escalável e apresentou uma proposta de negócio inovadora e com um grande potencial de crescimento. O Modelo desenvolvido no Laboratório de Negócios Midas prevê o projeto e construção de instalações industriais, apoio técnico e desenvolvimento de atividades direcionadas para a produção de PHA fortalecendo parcerias com universidades, centros de pesquisa e parceiros industriais.

O projeto de escalonamento para uma planta piloto foi pensado para unidades com capacidade de produzir cinco toneladas ao ano de biopolímero biodegradável. O segmento de clientes de interesse nos primeiros cinco anos foi direcionado ao mercado de embalagens e descartáveis e em 10 anos poderá ser ampliado para o mercado de não tecidos, têxteis, área médica e insumos para a agricultura.

**Market Analysis Report - Plastics, Polymers & Resins - Bioplastics Market Size, Share, Growth Report, 2020-2027. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/>*

**Bioplastics Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Biodegradable, Non-biodegradable), by Application (Packaging, Automotive & Transportation, Textile), by Region, and Segment Forecasts, 2020 – 2027.*

7 CONCLUSÕES

No presente estudo, experimentos foram conduzidos para produzir PHA de diferentes resíduos agroindustriais utilizando linhagens de *Bacillus sp.*

As estruturas do PHA obtidas inicialmente em escala de bancada foram de oligômeros de P3HB e P3HP (especificamente no cultivo a partir de pele de amendoim), demonstrando uma relação direta do tipo de estrutura do PHA obtido para cada matéria prima e microrganismo cultivado.

Com ajustes no bioprocessamento foram obtidos copolímeros P(3HBcoHP) (poli-3-hidroxi-butirato-co-propionato) e P(3HBcoHV) (poli-3-hidroxi-butirato-co-valerato) nos cultivos mistos em biorreator de 2L utilizando (farelo de trigo/pele de amendoim) e (farelo de trigo/bagaço de cana), respectivamente. Do cultivo realizado com *Bacillus licheniformis* em (pele de amendoim/bagaço de cana/farelo de trigo) foi obtido um PHA aromático caracterizado como P(3HFB) (poli-3-hidroxi-fenil-butirato).

O cultivo em batelada com reforço alternado em lotes foi capaz de produzir biopolímeros com diferentes estruturas e foi escalonado da etapa de bancada até o volume em escala piloto de 35 L com os resíduos de pele de amendoim e farelo de trigo reproduzindo a produção de P(3HB) e P(3HBcoHP). Os resultados demonstraram a eficiência da estratégia utilizada para a produção de PHA com bons rendimentos reacionais, a partir de um bioprocessamento único e de baixo custo, que pode ser adaptado para resíduos agroindustriais gerados em diferentes períodos sazonais. O melhor processo de extração do PHA foi obtido com uso de solvente não clorado (carbonato de polipropileno) que pode ser reutilizado por várias extrações sem necessidade de purificação.

Os PHAs obtidos apresentaram boas propriedades físicas e mecânicas em comparação ao produto líder de mercado, poliácido láctico (PLA), não apresentaram toxicidade nos ensaios com células e germinação de sementes e os resultados de biodegradação atenderam aos requisitos para possíveis aplicações biomédicas e para compor filmes para alimentos.

Em suma, essa tese alega que a produção de PHA pode ser realizada a partir de diferentes resíduos agroindustriais através de processo fermentativo simplificado

de alto rendimento utilizando microrganismos do tipo *Bacillus sp.* As estratégias utilizadas demonstraram eficiência com a redução de etapas e o modelo desenvolvido torna-se uma vantagem competitiva sustentável, tanto para as empresas geradoras como para toda cadeia de suprimentos a qual pertencem.

Neste sentido, este estudo estabelece uma alternativa sustentável para o gerenciamento e valorização de resíduos agroindustriais evidenciando um caminho para melhor aproveitamento de resíduos sólidos agroindustriais em um cenário de crescente consumo e alta demanda por produtos de ciclo curto.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Herrera, A. *et al.* Microplastic ingestion by Atlantic chub mackerel (*Scomber colias*) in the Canary Islands coast. *Mar. Pollut. Bull.* **139**, 127–135 (2019).
2. Kim, Y. & Kim, D. H. Pretreatment of low-grade poly(ethylene terephthalate) waste for effective depolymerization to monomers. *Korean J. Chem. Eng.* **35**, 2303–2312 (2018).
3. Chae, C. G. *et al.* Biosynthesis of poly(2-hydroxybutyrate-co-lactate) in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **21**, 169–174 (2016).
4. Choi, S. Y. *et al.* One-step fermentative production of poly(lactate-co-glycolate) from carbohydrates in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **34**, 435–440 (2016).
5. Kind, S. *et al.* From zero to hero - Production of bio-based nylon from renewable resources using engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.* **25**, 113–123 (2014).
6. David, Y. *et al.* Screening of microorganisms able to degrade low-rank coal in aerobic conditions: Potential coal biosolubilization mediators from coal to biochemicals. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **22**, 178–185 (2017).
7. Park, S. J. *et al.* Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates containing 2-hydroxybutyrate from unrelated carbon source by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 273–283 (2012).
8. Choi, S. Y. *et al.* Metabolic engineering for the synthesis of polyesters: A 100-year journey from polyhydroxyalkanoates to non-natural microbial polyesters. *Metab. Eng.* 1–35 (2019). doi:10.1016/j.ymben.2019.05.009
9. Chae, T. U., Choi, S. Y., Kim, J. W., Ko, Y. S. & Lee, S. Y. Recent advances in systems metabolic engineering tools and strategies. *Curr. Opin. Biotechnol.* **47**, 67–82 (2017).
10. Lenz, R. W. & Marchessault, R. H. Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules* **6**, 1–8 (2005).
11. Schmidell, Willibaldo; Lima, Urgel de Almeida; Aquarone, Eugênio; Borzani, W. *Biotechnologia Industrial*. (Edgard Blücher Ltda., 2019).
12. Masood, F., Hasan, F., Ahmed, S. & Hameed, A. Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from *Bacillus cereus* FA11 isolated from TNT-contaminated soil. *Ann. Microbiol.* **62**, 1377–1384 (2012).
13. Masood, F., Abdul-Salam, M., Yasin, T. & Hameed, A. Effect of glucose and olive oil as potential carbon sources on production of PHAs copolymer and tercopolymer by *Bacillus cereus* FA11. *3 Biotech* **7**, (2017).
14. Lu, J., Tappel, R. C. & Nomura, C. T. Mini-review: Biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates). *Polym. Rev.* **49**, 226–248 (2009).
15. Jendrossek, D., Selchow, O. & Hoppert, M. Poly(3-hydroxybutyrate) granules at the early stages of formation are localized close to the cytoplasmic membrane in *Caryophanon latum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 586–593 (2007).
16. Obruca, S., Sedlacek, P., Koller, M., Kucera, D. & Pernicova, I. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances* **36**, (2018).
17. Bresan, S. *et al.* Polyhydroxyalkanoate (PHA) granules have no phospholipids. *Sci. Rep.* **6**, 1–13 (2016).

18. Chee, J. Y., Lau, N. S., Samian, M. R., Tsuge, T. & Sudesh, K. Expression of *Aeromonas caviae* polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Burkholderia* sp. USM (JCM15050) enables the biosynthesis of SCL-MCL PHA from palm oil products. *J. Appl. Microbiol.* **112**, 45–54 (2012).
19. Gahlawat, G. *Production Strategies for Commercialization of PHA*. (2019). doi:10.1007/978-3-030-33897-8_4
20. Jacquel, N., Lo, C. W., Wei, Y. H., Wu, H. S. & Wang, S. S. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochem. Eng. J.* **39**, 15–27 (2008).
21. Gahlawat, G. & Soni, S. K. Valorization of waste glycerol for the production of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer by *Cupriavidus necator* and extraction in a sustainable manner. *Bioresour. Technol.* **243**, 492–501 (2017).
22. Fiorese, M. L. *et al.* Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate. *Eng. Life Sci.* **9**, 454–461 (2009).
23. Fei, T., Cazeneuve, S., Wen, Z., Wu, L. & Wang, T. Effective recovery of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biopolymer from *Cupriavidus necator* using a novel and environmentally friendly solvent system. *Biotechnol. Prog.* **32**, 678–685 (2016).
24. Wei, Y.-H. H. *et al.* Screening and evaluation of polyhydroxybutyrate-producing strains from indigenous isolate *Cupriavidus taiwanensis* strains. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 252–265 (2011).
25. Gao, Y. *et al.* Development of genetically stable *Escherichia coli* strains for poly(3-hydroxypropionate) production. *PLoS One* **9**, 1–8 (2014).
26. Park, S. J. *et al.* Metabolic engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of polyhydroxyalkanoates from sucrose. *Biotechnol. Bioeng.* **112**, 638–643 (2015).
27. Verlinden, R. A. J. *et al.* Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*. *AMB Express* **1**, 1–8 (2011).
28. Koller, M. Advances in polyhydroxyalkanoate (PHA) production, volume 2. *Bioengineering* **7**, 1–6 (2020).
29. Bhattacharya, S., Dubey, S., Singh, P., Shrivastava, A. & Mishra, S. Biodegradable polymeric substances produced by a marine bacterium from a surplus stream of the biodiesel industry. *Bioengineering* **3**, (2016).
30. Povolò, S., Romanelli, M. G., Fontana, F., Basaglia, M. & Casella, S. Production of Polyhydroxyalkanoates from Fatty Wastes. *J. Polym. Environ.* **20**, 944–949 (2012).
31. Hokamura, A., Yunoue, Y., Goto, S. & Matsusaki, H. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate from steamed soybean wastewater by a recombinant strain of *Pseudomonas* sp. 61-3. *Bioengineering* **4**, (2017).
32. Chen, Z., Huang, L., Wen, Q. & Guo, Z. Efficient polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation by a new continuous feeding mode in three-stage mixed microbial culture (MMC) PHA production process. *J. Biotechnol.* **209**, 68–75 (2015).
33. Zhila, N. & Shishatskaya, E. Properties of PHA bi-, ter-, and quarter-polymers containing 4-hydroxybutyrate monomer units. *Int. J. Biol. Macromol.* **111**, 1019–1026 (2018).

34. Koller, M. Chemical and biochemical engineering approaches in manufacturing polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters of tailored structure with focus on the diversity of building blocks. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **32**, 413–438 (2018).
35. Matsumoto, K. & Taguchi, S. Biosynthetic polyesters consisting of 2-hydroxyalkanoic acids: Current challenges and unresolved questions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 8011–8021 (2013).
36. Taguchi, S. Current advances in microbial cell factories for lactate-based polyesters driven by lactate-polymerizing enzymes: Towards the further creation of new LA-based polyesters. *Polym. Degrad. Stab.* **95**, 1421–1428 (2010).
37. Steinbüchel, A. & Valentin, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**, 219–228 (1995).
38. Tsuge, T., Hyakutake, M. & Mizuno, K. Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 6231–6240 (2015).
39. Tariq, A., Hameed, A., Bokhari, H. & Masood, F. Is atomic rearrangement of type IV PHA synthases responsible for increased PHA production? *J. Biomol. Struct. Dyn.* **33**, 1225–1238 (2015).
40. Chek, M. F. *et al.* Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from *Chromobacterium* sp. USM2, producing biodegradable plastics. *Sci. Rep.* **7**, 1–15 (2017).
41. Singh, M., Patel, S. K. & Kalia, V. C. *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates. *Microb. Cell Fact.* **8**, 38 (2009).
42. Singh Saharan, B., Grewal, A. & Kumar, P. Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates: A Review on Trends and Latest Developments. *Chinese J. Biol.* **2014**, 1–18 (2014).
43. Kumar, P., Patel, S. K. S., Lee, J. K. & Kalia, V. C. Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications. *Biotechnol. Adv.* **31**, 1543–1561 (2013).
44. Sangkharak, K. & Prasertsan, P. The production of polyhydroxyalkanoate by *Bacillus licheniformis* using sequential mutagenesis and optimization. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **18**, 272–279 (2013).
45. Rajendran R., Kanimozhi, B., Latha D., P. P. PG & Research Department of Microbiology, PSG College of Arts & Science, Coimbatore, Tamilnadu, India. *A J. Sci. Technol.* **2**, 18–24 (2014).
46. Suwannasing, W., Imai, T. & Kaewkannetra, P. *Cost-effective defined medium for the production of polyhydroxyalkanoates using agricultural raw materials.* *Bioresource Technology* **194**, (Elsevier Ltd, 2015).
47. Vishnuvardhan Reddy, S., Thirumala, M. & Mahmood, S. K. Production of PHB and P (3HB-co-3HV) biopolymers by *Bacillus megaterium* strain OU303A isolated from municipal sewage sludge. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 391–397 (2009).
48. Anil Kumar, P. K. *et al.* Bacterial synthesis of poly(hydroxybutyrate- co-hydroxyvalerate) using carbohydrate-rich mahua (*Madhuca* sp.) flowers. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 204–209 (2007).
49. Phukon, P., Saikia, J. P. & Konwar, B. K. Bio-plastic (P-3HB-co-3HV) from *Bacillus circulans* (MTCC 8167) and its biodegradation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **92**, 30–34 (2012).

50. Satoh, Y., Minamoto, N., Tajima, K. & Munekata, M. Polyhydroxyalkanoate synthase from *Bacillus* sp. INT005 is composed of phaC and phaR. *J. Biosci. Bioeng.* (2002). doi:10.1263/jbb.94.343
51. Valappil, S. P. *et al.* Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. *J. Biotechnol.* **132**, 251–258 (2007).
52. Wang, Y. *et al.* Biosynthesis and Thermal Properties of PHBV Produced from Levulinic Acid by *Ralstonia eutropha*. *PLoS One* **8**, 4–11 (2013).
53. Koller, M. A review on established and emerging fermentation schemes for microbial production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters. *Fermentation* **4**, (2018).
54. Braunegg, G. *et al.* Production of PHAs from agricultural waste material. *Macromol. Symp.* **144**, 375–383 (1999).
55. F. Wang. Poly(3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Batch Culture of *Alcaligenes latus* under Nitrogen Limitation. *Appl. Environmental Microbiol.* **63**, 3703–3706 (1997).
56. Serafim, L. S., Lemos, P. C., Torres, C., Reis, M. A. M. & Ramos, A. M. The influence of process parameters on the characteristics of polyhydroxyalkanoates produced by mixed cultures. *Macromol. Biosci.* **8**, 355–366 (2008).
57. Rodriguez-Perez, S., Serrano, A., Pantión, A. A. & Alonso-Fariñas, B. Challenges of scaling-up PHA production from waste streams. A review. *J. Environ. Manage.* **205**, 215–230 (2018).
58. Novak, M., Koller, M., Braunegg, G. & Horvat, P. Mathematical modelling as a tool for optimized PHA production. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **29**, 183–220 (2015).
59. Kamravamanesh, D., Lackner, M. & Herwig, C. Bioprocess engineering aspects of sustainable polyhydroxyalkanoate production in cyanobacteria. *Bioengineering* **5**, 1–18 (2018).
60. Albuquerque, M. G. E., Eiroa, M., Torres, C., Nunes, B. R. & Reis, M. A. M. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. *J. Biotechnol.* **130**, 411–421 (2007).
61. Serafim, L. S., Lemos, P. C., Oliveira, R. & Reis, M. A. M. Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **87**, 145–160 (2004).
62. Anjum, A. *et al.* Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *Int. J. Biol. Macromol.* **89**, 161–174 (2016).
63. European-bioplastics.org/. EUBP Conference 2019.
64. Rodriguez-Contreras, A. Recent advances in the use of polyhydroxyalkanoates in biomedicine. *Bioengineering* **6**, 1–14 (2019).
65. Wimmer, W., Zuest, R., Lee, K. & for Global Sustainability, A. ECODESIGN Implementation: A Systematic Guidance on Integrating Environmental Considerations into Product Development. in 140 (2004).
66. Lisboa, M. P., Bonatto, D., Bizani, D., Henriques, J. A. P. & Brandelli, A. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. *Int. Microbiol.* **9**, 111–118 (2006).

67. Rabinovitch, L. & Oliveira, E. J. de. *Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de Bacillus e gêneros esporulados aeróbios correlatos*. (LFB - FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz, 2015).
68. Sluiter, A. *et al.* Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. *Tech. Rep. NREL/TP-510-42618* 1–15 (2011). doi:NREL/TP-510-42618
69. Sluiter, J. B., Ruiz, R. O., Scarlata, C. J., Sluiter, A. D. & Templeton, D. W. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 9043–9053 (2010).
70. Arslan, Y. & Eken-Saraçoğlu, N. Effects of pretreatment methods for hazelnut shell hydrolysate fermentation with *Pichia Stipitis* to ethanol. *Bioresour. Technol.* **101**, 8664–8670 (2010).
71. Chi, Z. *et al.* Overliming detoxification of pyrolytic sugar syrup for direct fermentation of levoglucosan to ethanol. *Bioresour. Technol.* **150**, 220–227 (2013).
72. Morais, S. A. L. de, Nascimento, E. A. do & Melo, D. C. de. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I: estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. *Rev. Árvore* **29**, 461–470 (2005).
73. Marconcini, J. P. S. M. M. de F. R. J. M. *Procedimentos para Análise Lignocelulósica*. Embrapa **236**, (2010).
74. Doran, P. M. *Bioprocess Engineering principles*. (Editorial Acirbia S.A., 1995).
75. Rosario, C. G. A. Avaliação da degradação microbiana de cianeto usando cepas isoladas de rejeito de mineração. (Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2017).
76. Kunasundari, B. & Sudesh, K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polym. Lett.* **5**, 620–634 (2011).
77. Kalia, V. C., Ray, S., Patel, S. K. S., Singh, M. & Singh, G. P. The Dawn of Novel Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Appl. Polyhydroxyalkanoates* 1–11 (2019). doi:10.1007/978-981-13-3759-8_1
78. ASTM International. *ASTM D3173 / D3173M-17a Standard Test Method for Moisture in the Analysis Sample of Coal and Coke*. (2017). doi:10.1520/D3173_D3173M-17A
79. ASTM International. *ASTM D7582-10 Standard Test Methods for Proximate Analysis of Coal and Coke by Macro Thermogravimetric Analysis*. (2010). doi:10.1520/D7582-10
80. Thommes, M. *et al.* Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **87**, 1051–1069 (2015).
81. Ilavsky, J. & Jemian, P. Irena: tool suite for modeling and analysis of small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.* **42**, 347–353 (2009).
82. Beaucage, G. Approximations Leading to a Unified Exponential/Power-Law Approach to Small-Angle Scattering. *J. Appl. Crystallogr.* **28**, 717–728 (1995).
83. Beaucage, G. Small-angle scattering from polymeric mass fractals of arbitrary mass-fractal dimension. *J. Appl. Crystallogr.* **29**, 134–146 (1996).
84. Lee, R. A., Bédard, C., Berberic, V., Beauchet, R. & Lavoie, J. M. UV-Vis as quantification tool for solubilized lignin following a single-shot steam process. *Bioresour. Technol.* **144**, 658–663 (2013).
85. Negrulescu, A. *et al.* Adapting the reducing sugars method with dinitrosalicylic acid to microtiter plates and microwave heating. *J. Braz. Chem. Soc.* **23**, 2176–2182 (2012).

86. Miller, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426–428 (1959).
87. ASTM D 882-09. *Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting*. (2009). doi:10.1520/D0882-09
88. Repetto, G., del Peso, A. & Zurita, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. *Nat. Protoc.* **3**, 1125–1131 (2008).
89. Rocha, J. C., Busatto, F. F., de Souza, L. K. & Saffi, J. Influence of nucleotide excision repair on mitoxantrone cytotoxicity. *DNA Repair (Amst)*. **42**, 33–43 (2016).
90. Vaucher, R. A., de Souza da Motta, A. & Brandelli, A. Evaluation of the in vitro cytotoxicity of the antimicrobial peptide P34. *Cell Biol. Int.* **34**, 317–323 (2010).
91. ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas. *ABNT NBR 15448-2:2008 - Embalagens plásticas degradáveis e/ou de fontes renováveis Parte 2: Biodegradação e compostagem - Requisitos e métodos de ensaio*. ABNT NBR 15448-2:2008 10 (2008).
92. ASTM D 1435-13. *Standard Practice for Outdoor Weathering of Plastics*. (2013). doi:10.1520/D1435-13
93. Montagna, L. S. Desenvolvimento de polipropileno ambientalmente degradável. (UFRGS, 2014).
94. Montagna, L. S., Forte, M. M. D. C. & Santana, R. M. C. Study on the accelerated biodegradation of PP modified with an organic pro-degradant additive. *J. Appl. Polym. Sci.* **131**, 3–7 (2014).
95. International Organization for Standardization. ISO 17556:2012 Plastics - Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in soil by measuring the oxygen demand in a respirometer or the amount of carbon dioxide evolved. 26 (2012).
96. Montagna, L. S., Catto, A. L., Camargo Forte, M. M. de & Campomanes Santana, R. M. Biodegradation of PP films modified with organic pro-degradant: Natural ageing and biodegradation in soil in respirometric test. *Polyolefins J.* **3**, 59–68 (2016).
97. International Organization for Standardization. *ISO 14855-2:2007 Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials under controlled composting conditions — Method by analysis of evolved carbon dioxide, Part 2: Gravimetric measurement of carbon dioxide evolved in a laboratory-s.* (2007).
98. Almond, J., Sugumaar, P., Wenzel, M. N., Hill, G. & Wallis, C. Determination of the carbonyl index of polyethylene and polypropylene using specified area under band methodology with ATR-FTIR spectroscopy. *E-Polymers* **20**, 369–381 (2020).
99. Chemicals, O. G. for T. *Terrestrial Plant Test: 208: Seedling Emergence and Seedling Growth Test*. *OECD iLibrary* **227**, (2015).
100. Zhang, J. *et al.* Thermogravimetric analysis of lignocellulosic biomass with ionic liquid pretreatment. *Bioresour. Technol.* **153**, 379–382 (2014).
101. Wang, J. *et al.* Effect of long-term aging at 350°C on dynamic fracture toughness of 17-4PH stainless steel. *Yuanzineng Kexue Jishu/Atomic Energy Sci. Technol.* **40**, (2006).
102. Singh, S. *et al.* Understanding the impact of ionic liquid pretreatment on cellulose and lignin via thermochemical analysis. *Biomass and Bioenergy* **54**, 276–283 (2013).

103. Murillo, J. D., Biernacki, J. J., Northrup, S. & Mohammad, A. S. Biomass pyrolysis kinetics: A review of molecular-scale modeling contributions. *Brazilian J. Chem. Eng.* **34**, 1–18 (2017).
104. Palmqvist, E. & Hahn-Hägerdal, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.* **74**, 25–33 (2000).
105. Ponnusamy, V. K. *et al.* A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential. *Bioresour. Technol.* **271**, 462–472 (2019).
106. Edens, R. E. Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility, 2nd ed Edited by Severian Dumitriu (University of Sherbrooke, Quebec). Marcel Dekker: New York. 2005. xviii + 1204 pp. \$269.95. ISBN 0-8247-5480-8. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 10119 (2005).
107. de Camargo, A. C. *et al.* Phenolic acids and flavonoids of peanut by-products: Antioxidant capacity and antimicrobial effects. *Food Chem.* **237**, 538–544 (2017).
108. Manara, P., Zabaniotou, A., Vanderghem, C. & Richel, A. Lignin extraction from Mediterranean agro-wastes: Impact of pretreatment conditions on lignin chemical structure and thermal degradation behavior. *Catal. Today* **223**, 25–34 (2014).
109. Sills, D. L. & Gossett, J. M. Using FTIR to predict saccharification from enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated biomasses. *Biotechnol. Bioeng.* **109**, 353–362 (2012).
110. Fan, M., Dai, D. & Huang, B. Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Natural Fibres. *Fourier Transform - Mater. Anal.* (2012). doi:10.5772/35482
111. Karimi, K. & Taherzadeh, M. J. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity. *Bioresour. Technol.* **200**, 1008–1018 (2016).
112. Guilherme, A. A., Dantas, P. V. F., Santos, E. S., Fernandes, F. A. N. & Macedo, G. R. Evaluation of composition, characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse. *Brazilian J. Chem. Eng.* **32**, 23–33 (2015).
113. Putnam, C. D., Hammel, M., Hura, G. L. & Tainer, J. A. X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q. Rev. Biophys.* **40**, 191–285 (2007).
114. Chen, Z. & Wan, C. Biological valorization strategies for converting lignin into fuels and chemicals. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **73**, 610–621 (2017).
115. Blazek, J. & Gilbert, E. P. Application of small-angle X-ray and neutron scattering techniques to the characterisation of starch structure: A review. *Carbohydr. Polym.* **85**, 281–293 (2011).
116. Pereira, N. R. L., Anjos, F. E. & Magnago, R. F. Lignocellulosic residues of banana cultivation: A review of the cellulose extraction chemical processes. *Rev. Virtual Quim.* **11**, 1165–1179 (2019).
117. Chen, H., Zhao, X. & Liu, D. Relative Significance of the Negative Impacts of Hemicelluloses on Enzymatic Cellulose Hydrolysis Is Dependent on Lignin Content: Evidence from Substrate Structural Features and Protein Adsorption. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **4**, 6668–6679 (2016).

118. Semwal, S. *et al.* Structural features of dilute acid pretreated acacia mangium and impact of sodium sulfite supplementation on enzymatic hydrolysis. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **4**, 4635–4644 (2016).
119. Chanprateep, S. *et al.* Characterization of new isolated *Ralstonia eutropha* strain A-04 and kinetic study of biodegradable copolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 1205–1215 (2008).
120. Bowles, T. M., Acosta-Martínez, V., Calderón, F. & Jackson, L. E. Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic agroecosystems across an intensively-managed agricultural landscape. *Soil Biol. Biochem.* **68**, 252–262 (2014).
121. Tortora, Gerard J., Funke, Berdell R., Case, C. L., Weber, D., B. W. *Microbiology, An Introduction.* (2013).
122. Penloglou, G., Chatzidoukas, C. & Kiparissides, C. Microbial production of polyhydroxybutyrate with tailor-made properties: An integrated modelling approach and experimental validation. *Biotechnol. Adv.* **30**, 329–337 (2012).
123. Khanna, S. & Srivastava, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochem.* **40**, 607–619 (2005).
124. Dias, J. M. L. *et al.* Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: From the substrate to the final product. *Macromol. Biosci.* **6**, 885–906 (2006).
125. Devi, A Brinda; Valli Nachiyar, C; Kaviyarasi, T; Antony, V. S. Characterization of polyhydroxybutyrate synthesized by *Bacillus Cereus*. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **7**, (2015).
126. Venkateswar Reddy, M. *et al.* Production of poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) P(3HB-co-3HV) from synthetic wastewater using *Hydrogenophaga palleronii*. *Bioresour. Technol.* **215**, 155–162 (2016).
127. Aljuraifani, A. A., Berekaa, M. M. & Ghazwani, A. A. Bacterial biopolymer (polyhydroxyalkanoate) production from low-cost sustainable sources. *Microbiologyopen* 1–7 (2018). doi:10.1002/mbo3.755
128. Sadasivam, S., Sigamani, S., Venkatachalam, H. & Ramamurthy, D. A New Method for the Production of Polyhydroxyalkanoates by *Bacillus* sp. and Detect the Presence of PHA Synthase. *Smart Sci.* **6**, 105–116 (2018).
129. Mohapatra, S. *et al.* *Bacillus* and biopolymer: Prospects and challenges. *Biochem. Biophys. Reports* **12**, 206–213 (2017).
130. Balakrishna Pillai, A., Jaya Kumar, A., Thulasi, K. & Kumarapillai, H. Evaluation of short-chain-length polyhydroxyalkanoate accumulation in *Bacillus aryabhatai*. *Brazilian J. Microbiol.* **48**, 451–460 (2017).
131. Mohapatra, S. *et al.* Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus* Strain Isolated from Waste Water and Its Biochemical Characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B - Biol. Sci.* **87**, 459–466 (2017).
132. Kann, Y., Shurgalin, M. & Krishnaswamy, R. K. FTIR spectroscopy for analysis of crystallinity of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) polymers and its utilization in evaluation of aging, orientation and composition. *Polym. Test.* **40**, 218–224 (2014).
133. Yamanaka, K., Kimura, Y., Aoki, T. & Kudo, T. End-group analysis of bacterially produced poly(3-hydroxybutyrate): Discovery of succinate as the polymerization starter. *Macromolecules* **42**, 4038–4046 (2009).

134. Nakamura, S., Fouquet, T. & Sato, H. Molecular Characterization of High Molecular Weight Polyesters by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization High-Resolution Time-of-Flight Mass Spectrometry Combined with On-plate Alkaline Degradation and Mass Defect Analysis. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **30**, 355–367 (2019).
135. Li, S. D., Yu, P. H. & Cheung, M. K. Thermogravimetric analysis of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *J. Appl. Polym. Sci.* **80**, 2237–2244 (2001).
136. Mottina, A. C., Ayres, E., Orefice, R. L. & Câmara, J. J. D. What changes in poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) when processed as electrospun nanofibers or thermo-compression molded film? *Mater. Res.* **19**, 57–66 (2016).
137. Tan, D., Yin, J. & Chen, G. Q. *Production of Polyhydroxyalkanoates. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products* (Elsevier B.V., 2016). doi:10.1016/B978-0-444-63662-1.00029-4
138. Barbuzzi, T. *et al.* Microbial synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas aeruginosa* from fatty acids: Identification of higher monomer units and structural characterization. *Biomacromolecules* **5**, 2469–2478 (2004).
139. Fukui, T., Suzuki, M., Tsuge, T. & Nakamura, S. Microbial Synthesis of Poly ((R) -3-hydroxybutyrate- co - 3-hydroxypropionate) from Unrelated Carbon Sources by Engineered *Cupriavidus necator*. *Biomacromolecules* 700–706 (2009).
140. Zhou, Q. *et al.* Production of 3-hydroxypropionate homopolymer and poly(3-hydroxypropionate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer by recombinant *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* **13**, 777–785 (2011).
141. Kniewel, R., Lopez, O. R. & Prieto, M. A. Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes. *Biog. Fat. Acids, Lipids Membr.* 1–25 (2017). doi:10.1007/978-3-319-43676-0
142. Yu, J. & Chen, L. X. L. Cost-effective recovery and purification of polyhydroxyalkanoates by selective dissolution of cell mass. *Biotechnol. Prog.* **22**, 547–553 (2006).
143. Meng, D. C. *et al.* Engineering the diversity of polyesters. *Curr. Opin. Biotechnol.* **29**, 24–33 (2014).
144. Satoh, Y., Minamoto, N., Tajima, K. & Munekata, M. Polyhydroxyalkanoate synthase from *Bacillus* sp. INT005 is composed of phaC and phaR. *J. Biosci. Bioeng.* **94**, 343–350 (2002).
145. Jiang, Y., Hebly, M., Kleerebezem, R., Muyzer, G. & van Loosdrecht, M. C. M. Metabolic modeling of mixed substrate uptake for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Water Res.* **45**, 1309–1321 (2011).
146. Tomizawa, S. *et al.* Molecular weight change of polyhydroxyalkanoate (PHA) caused by the PhaC subunit of PHA synthase from *Bacillus cereus* YB-4 in recombinant *Escherichia coli*. *Biomacromolecules* **12**, 2660–2666 (2011).
147. Mohandas, S. P. *et al.* Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate from marine *Bacillus cereus* MCCB 281 utilizing glycerol as carbon source. *Int. J. Biol. Macromol.* **119**, (2018).
148. AOCS. The American Oil Chemists' Society. *Lipid Library* (2010). Available at: aocs.org. (Accessed: 12th November 2019)
149. Dong, X. Y. *et al.* Triacylglycerol composition profiling and comparison of high-oleic and normal peanut oils. *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* **92**, 233–242 (2015).

150. Diomandé, S. E., Nguyen-The, C., Guinebretière, M. H., Broussolle, V. & Brillard, J. Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. *Front. Microbiol.* **6**, 1–20 (2015).
151. Shimamura, E., Scandola, M. & Doi, Y. Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate). *Macromolecules* **27**, 4429–4435 (1994).
152. Pérez-Arauz, A. O. *et al.* Production and characterization of biodegradable films of a novel polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesized from peanut oil. *Food Packag. Shelf Life* **20**, 100297 (2019).
153. Cao, A. *et al.* Composition Fractionation and Thermal Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate). *Polym. J.* **28**, 1096–1102 (1996).
154. Hosokawa, M. N., Darros, A. B., Moris, V. A. da S. & Paiva, J. M. F. de. Polyhydroxybutyrate Composites with Random Mats of Sisal and Coconut Fibers. *Mater. Res.* **20**, 279–290 (2016).
155. Shalin, T., Sindhu, R., Binod, P., Soccol, C. R. & Pandey, A. Mixed cultures fermentation for the production of poly- β -hydroxybutyrate. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **57**, 644–652 (2014).
156. González García, Y., Meza Contreras, J. C., González Reynoso, O. & Córdova López, J. A. Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: Plásticos de origen microbiano. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **29**, 77–115 (2013).
157. Salgaonkar, B. B. & Bragança, J. M. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Halogeometricum borinquense* strain E3. *Int. J. Biol. Macromol.* **78**, 339–346 (2015).
158. Salgaonkar, B. B. & Bragança, J. M. Utilization of Sugarcane Bagasse by *Halogeometricum borinquense* Strain E3 for Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Bioengineering* **4**, 50 (2017).
159. Bayari, S. & Severcan, F. FTIR study of biodegradable biopolymers: P(3HB), P(3HB-co-4HB) and P(3HB-co-3HV). *J. Mol. Struct.* **744–747**, 529–534 (2005).
160. Wältermann, M. & Steinbüchel, A. Neutral lipid bodies in prokaryotes: Recent insights into structure, formation, and relationship to eukaryotic lipid depots. *J. Bacteriol.* **187**, 3607–3619 (2005).
161. Honma, T. *et al.* EP 1 118 629 A2 Polyhydroxyalkanoates and method of producing them by utilizing microorganisms. 95 (2001).
162. Und, E., Zur, V., Proben, U. V. O. N. & Einer, I. N. EP 1 340 776 B1. **1**, 107–128 (2011).
163. Schleifer, K.-H. Bergey's Manual - Firmicutes. *Syst. Bacteriol.* **5**, 19–1317 (2009).
164. Anson, N. M. *et al.* Bioprocessing of wheat bran improves in vitro bioaccessibility and colonic metabolism of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 6148–6155 (2009).
165. Díaz-García, M. C., Obón, J. M., Castellar, M. R., Collado, J. & Alacid, M. Quantification by UHPLC of total individual polyphenols in fruit juices. *Food Chem.* **138**, 938–949 (2013).
166. Rodríguez-Pérez, S., Serrano, A., Pantión, A. A. & Alonso-Fariñas, B. Challenges of scaling-up PHA production from waste streams. A review. *Journal of Environmental Management* **205**, (2018).
167. Koller, M., Maršálek, L., de Sousa Dias, M. M. & Braunegg, G. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *N. Biotechnol.* **37**, 24–38 (2017).

168. Bhatia, S. K. *et al.* Bioconversion of plant biomass hydrolysate into bioplastic (polyhydroxyalkanoates) using *Ralstonia eutropha* 5119. *Bioresour. Technol.* **271**, (2019).
169. Fradinho, J. C., Oehmen, A. & Reis, M. A. M. Photosynthetic mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from individual and mixed volatile fatty acids (VFAs): Substrate preferences and co-substrate uptake. *J. Biotechnol.* **185**, 19–27 (2014).
170. Gómez Cardozo, J. R., Mora Martínez, A. L., Yepes Pérez, M. & Correa Londoño, G. A. Production and Characterization of Polyhydroxyalkanoates and Native Microorganisms Synthesized from Fatty Waste. *Int. J. Polym. Sci.* **2016**, (2016).
171. Cruz, M. V., Sarraguça, M. C., Freitas, F., Lopes, J. A. & Reis, M. A. M. Online monitoring of P(3HB) produced from used cooking oil with near-infrared spectroscopy. *J. Biotechnol.* **194**, 1–9 (2015).
172. Jendrossek, D. & Pfeiffer, D. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environ. Microbiol.* **16**, 2357–2373 (2014).
173. Mora-Huertas, C. E., Fessi, H. & Elaissari, A. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification-diffusion methods: Critical comparison. *Adv. Colloid Interface Sci.* **163**, 90–122 (2011).
174. Algharib, S. A., Dawood, A. & Xie, S. Nanoparticles for treatment of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Drug Deliv.* **27**, 292–308 (2020).
175. Badasyan, A., Mavrič, A., Kralj Cigić, I., Bencik, T. & Valant, M. Polymer nanoparticle sizes from dynamic light scattering and size exclusion chromatography: The case study of polysilanes. *Soft Matter* **14**, 4735–4740 (2018).
176. Owen, A. & Bergmann, A. On the fractal character of polymer spherulites: An ultra-small-angle X-ray scattering study of poly[(R)-3-hydroxybutyrate]. *Polym. Int.* **53**, 12–14 (2004).
177. Bokrova, J., Marova, I., Matouskova, P. & Pavelkova, R. Fabrication of novel PHB-liposome nanoparticles and study of their toxicity in vitro. *J. Nanoparticle Res.* **21**, (2019).
178. Tappel, R. C., Kucharski, J. M., Mastroianni, J. M., Stipanovic, A. J. & Nomura, C. T. Biosynthesis of Poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] Copolymers with Controlled Repeating Unit Compositions and Physical Properties. *Biomacromolecules* **13**, 2964–2972 (2012).
179. Hufenus, R., Reifler, F. A., Maniura-Weber, K., Spierings, A. & Zinn, M. Biodegradable bicomponent fibers from renewable sources: Melt-spinning of poly(lactic acid) and poly[(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyvalerate)]. *Macromol. Mater. Eng.* **297**, 75–84 (2012).
180. Elmowafy, E. *et al.* Polyhydroxyalkanoate (PHA): Applications in drug delivery and tissue engineering. *Expert Rev. Med. Devices* **16**, 467–482 (2019).
181. Rodríguez-Contreras, A., Rupérez, E., Marqués-Calvo, M. S. & Manero, J. M. PHAs as matrices for drug delivery. *Materials for Biomedical Engineering* (2019). doi:10.1016/b978-0-12-816913-1.00007-6
182. Gérard, Thibaut; Budtova, T. PLA-PHA blends: morphology, thermal and mechanical properties. (2012).
183. Noda, I. Films comprising biodegradable PHA copolymers. *US Pat. 6,174,990* **1**, (2001).

184. Noda, Isao; Bond, Bryan; Melik, D. H. Polyhydroxycarbonate copolymer and Polylactic Acid Polymer Compositions for Laminates and Films - US 6 808 795 B2. **2**, (2004).
185. Townsend, K. J., Busse, K., Kressler, J. & Scholz, C. Contact angle, WAXS, and SAXS analysis of poly(β -hydroxybutyrate) and poly(ethylene glycol) block copolymers obtained via *Azotobacter vinelandii* UWD. *Biotechnol. Prog.* **21**, 959–964 (2005).
186. Vinhas, G. M., Almeida, Y. M. B. de, Lima, M. A. G. de A. & Santos, L. A. Estudo das propriedades e biodegradabilidade de blendas de poliéster/amido submetidas ao ataque microbiano. *Quim. Nova* **30**, 1584–1588 (2007).
187. Vink, E. T. H. & Davies, S. Life Cycle Inventory and Impact Assessment Data for 2014 Ingeo® Polylactide Production. *Ind. Biotechnol.* **11**, 167–180 (2015).
188. Ministério da Agricultura, P. e A. www.conab.gov.br. *Boletim da safra de grãos* (2020).
189. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Agropecuária. Available at: embrapa.br. (Accessed: 28th March 2018)
190. Mejias, R. G. Bioeconomia e suas aplicações. *ÍANDÉ Ciências e Humanidades* **2**, 105–121 (2019).

APÊNDICE A1 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA AGROINDUSTRIAL

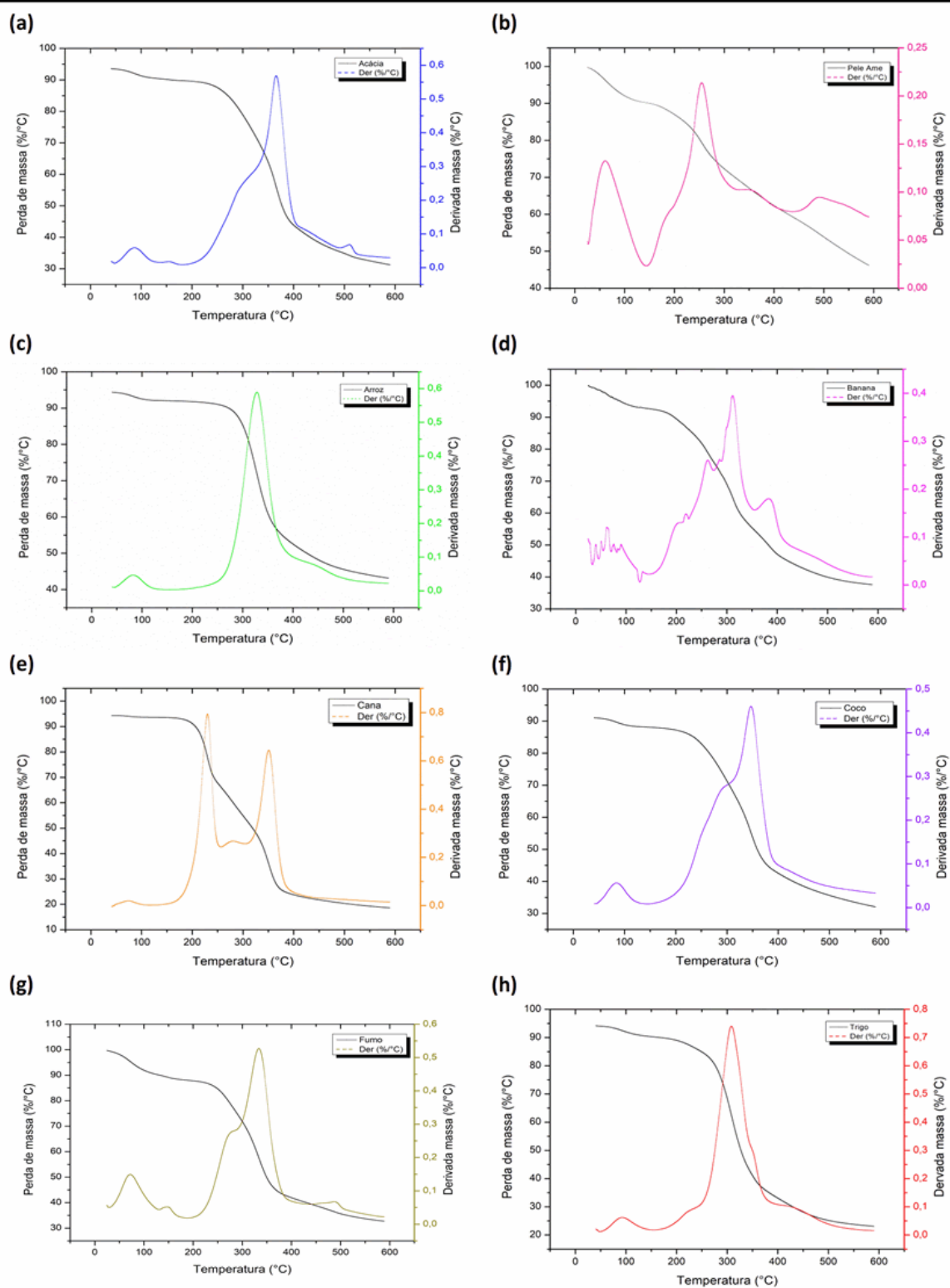


Figura A1 – Termogramas obtidos das biomassas agroindustriais: (a) Casca de Acácia, (b) Pele de amendoim, (c) Casca de arroz, (d) Casca de banana, (e) Bagaço de cana, (f) Fibra de coco, (g) Taló de Fumo e (h) Farelo de Trigo.

APÊNDICE A2
CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA AGROINDUSTRIAL

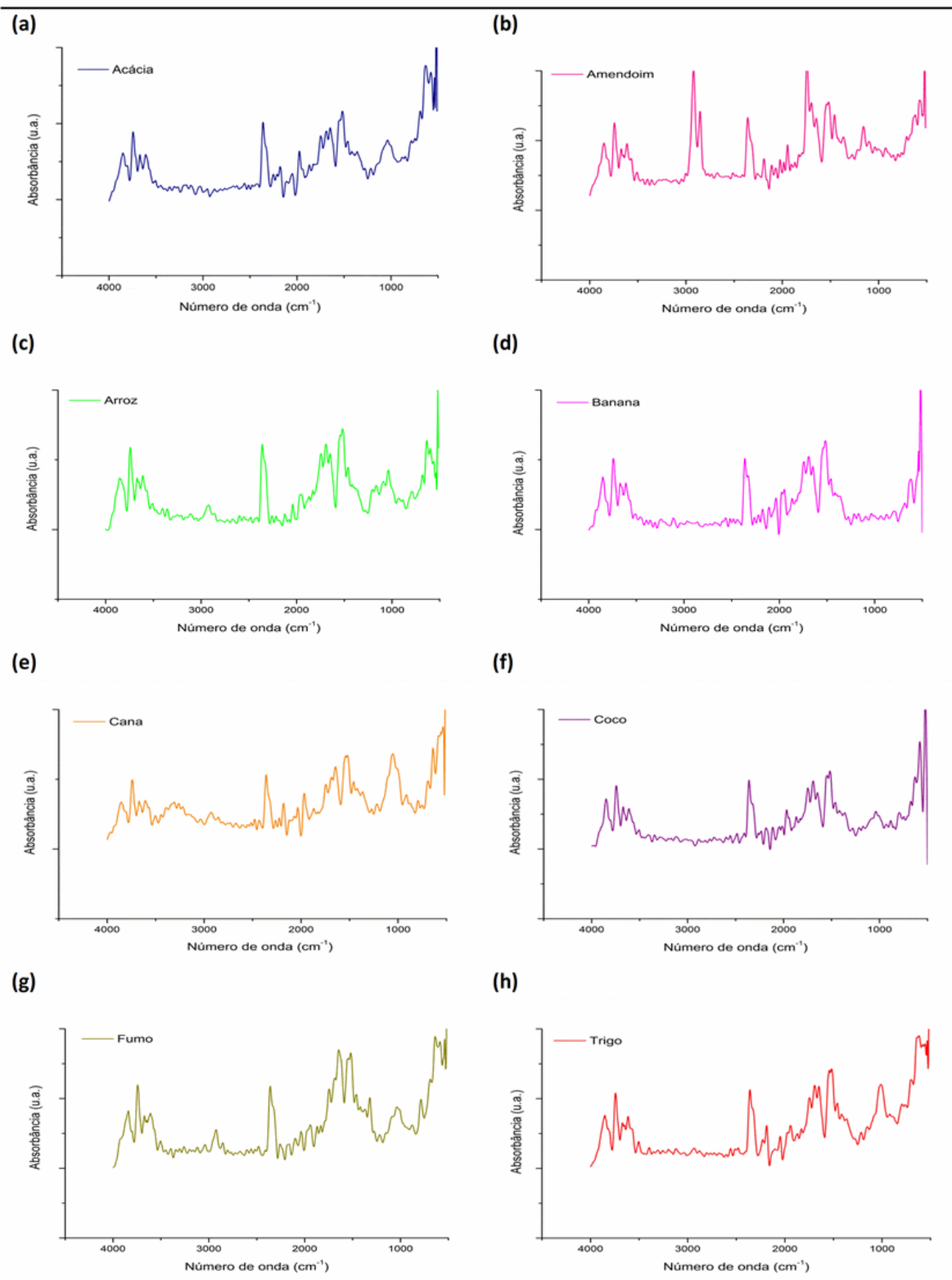


Figura A2 – Espectro de infravermelho em modo ATR (convertidos em absorbância) das biomassas agroindustriais: (a) Casca de Acácia, (b) Pele de amendoim, (c) Casca de arroz, (d) Casca de banana, (e) Bagaço de cana, (f) Fibra de coco, (g) Talo de Fumo e (h) Farelo de Trigo.

APÊNDICE A3
CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA AGROINDUSTRIAL

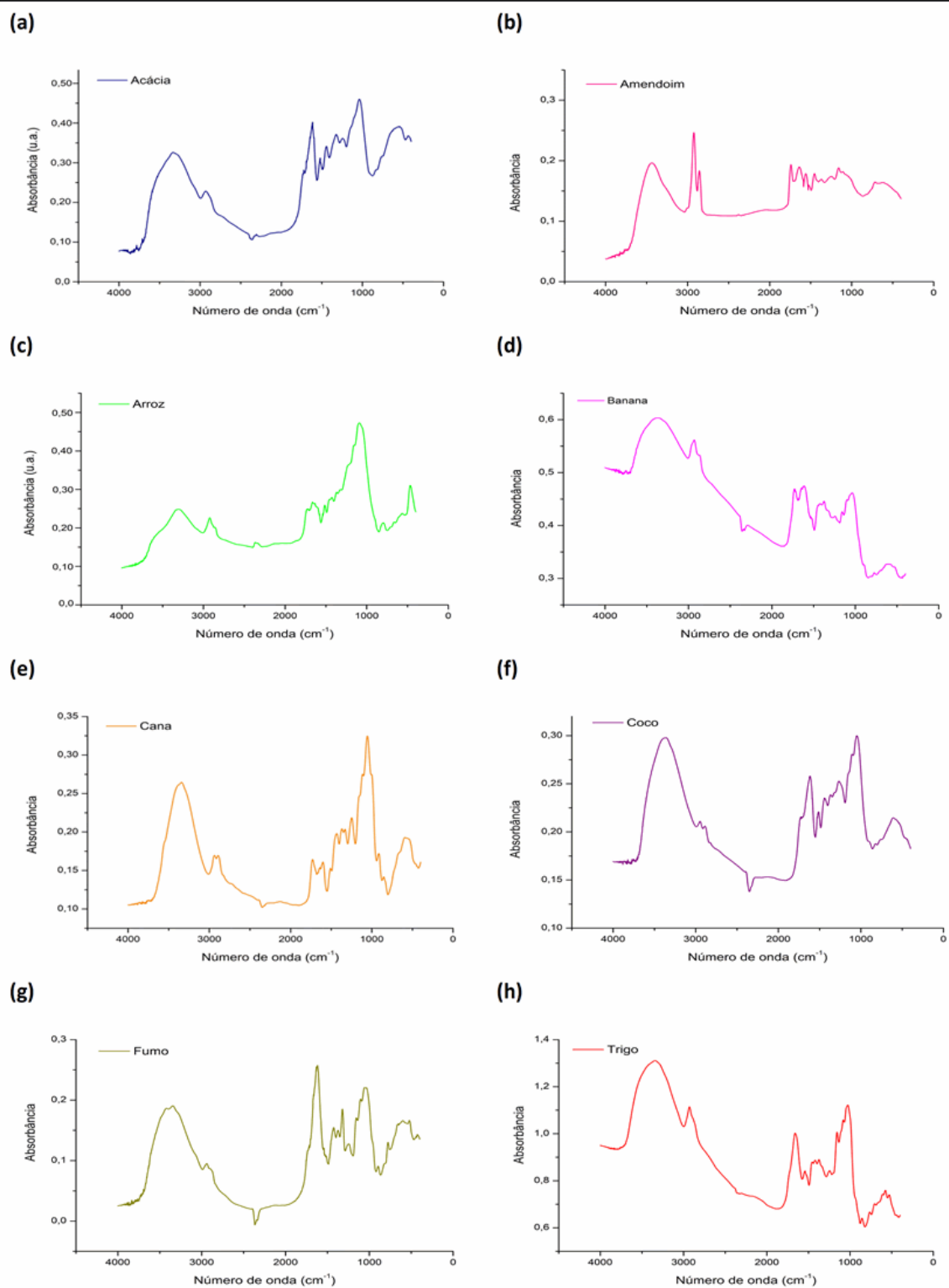


Figura A3 – Espectros de infravermelho (FTIR) das biomassas agroindustriais: (a) Casca de Acácia, (b) Pele de amendoim, (c) Casca de arroz, (d) Casca de banana, (e) Bagaço de cana, (f) Fibra de coco, (g) Talo de Fumo e (h) Farelo de Trigo.

APÊNDICE A4 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA AGROINDUSTRIAL

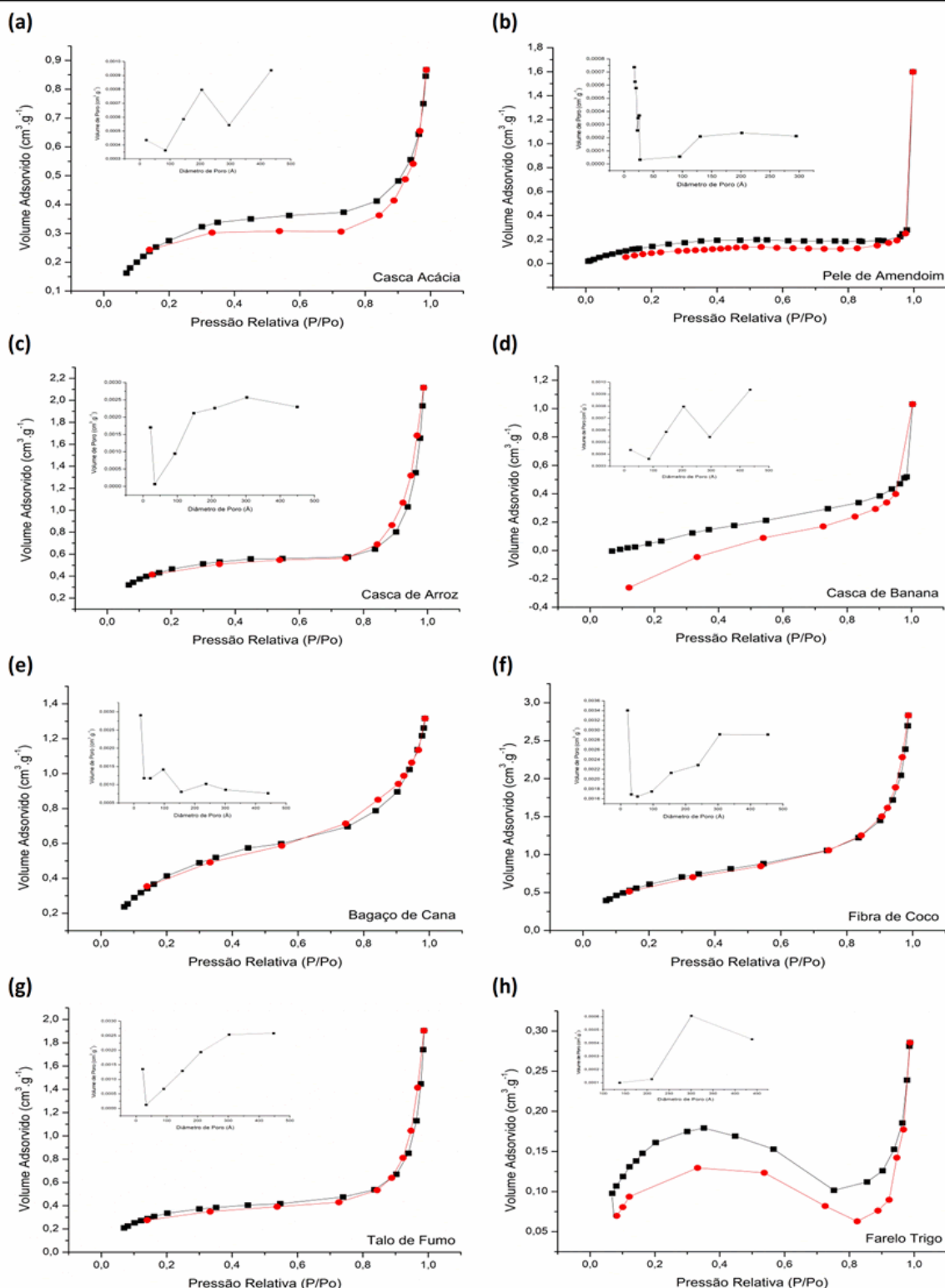


Figura A4 – Isothermas obtidas por Adsorção de nitrogênio (BET) das biomassas agroindustriais, no detalhe distribuição de poros: (a) Casca de Acácia, (b) Pele de amendoim, (c) Casca de arroz, (d) Casca de banana, (e) Bagaço de cana, (f) Fibra de coco, (g) Talo de Fumo e (h) Farelo de Trigo.

APÊNDICE A5 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA AGROINDUSTRIAL

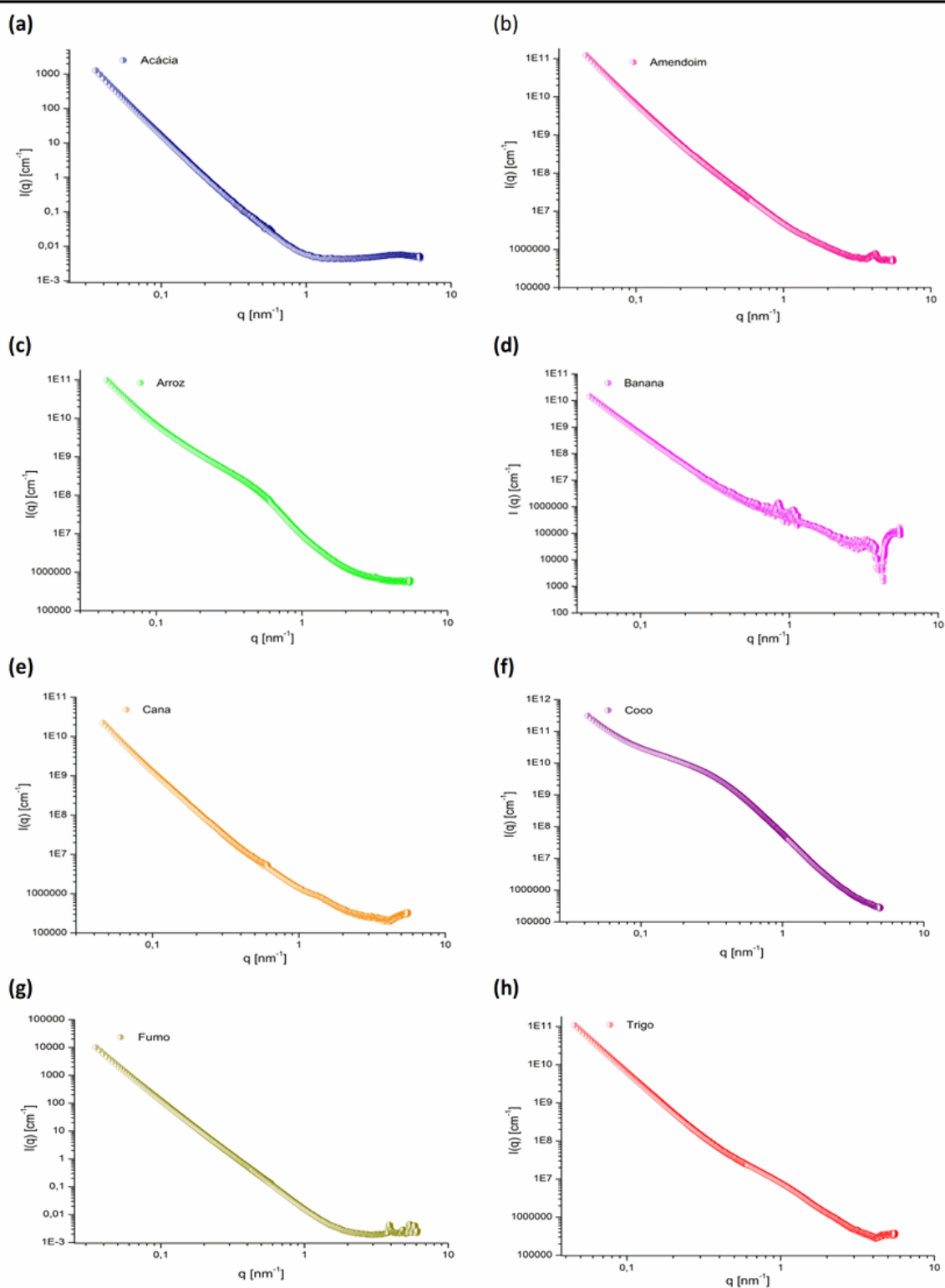
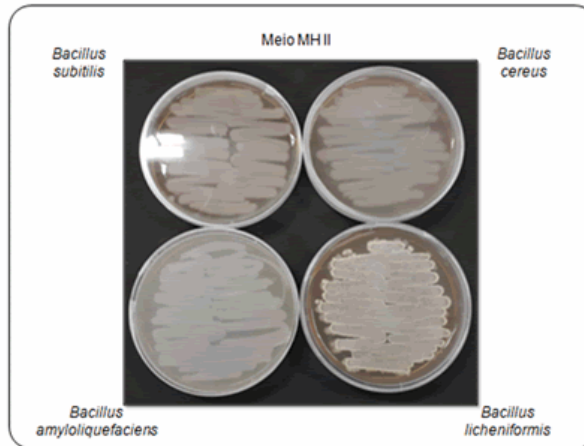


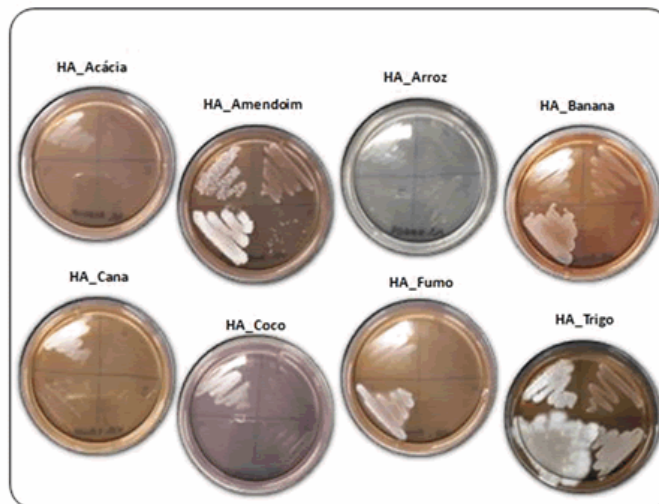
Figura A5 – Análises por espalhamento de Raios-X a baixos ângulos (SAXS) das biomassa agroindustriais: (a) Casca de Acácia, (b) Pele de amendoim, (c) Casca de arroz, (d) Casca de banana, (e) Bagaço de cana, (f) Fibra de coco, (g) Talo de Fumo e (h) Farelo de Trigo.

APÊNDICE B1
CULTIVOS DOS MICRORGANISMOS

(a)



(b)



(c)

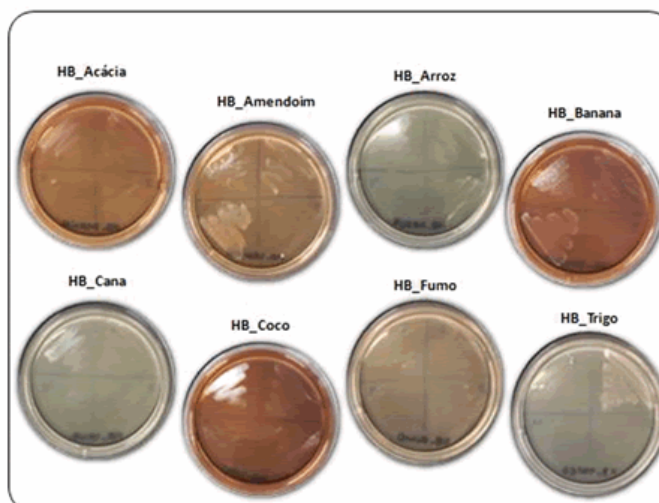


Figura B1 – Imagens das placas de Petri com cultivos em meio sólido das diferentes biomassas: (a) Cultivo em meio sólido Muller Hinton II (controle), (b) Cultivo em Meio sólido dos hidrolisados ácidos e (c) Cultivo em meio sólido dos hidrolisados alcalinos.

APÊNDICE B2
CULTIVOS DOS MICRORGANISMOS

(a)



Casca de Acácia



Pele Amendoim



Casca de Arroz



Casca de Banana



Bagaço de Cana



Fibra de Coco

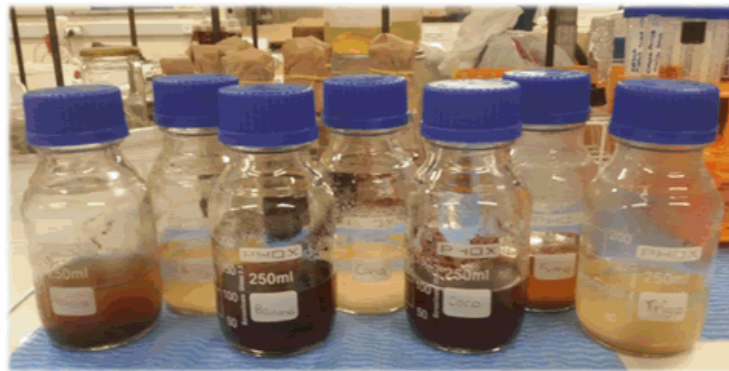


Talo de Fumo

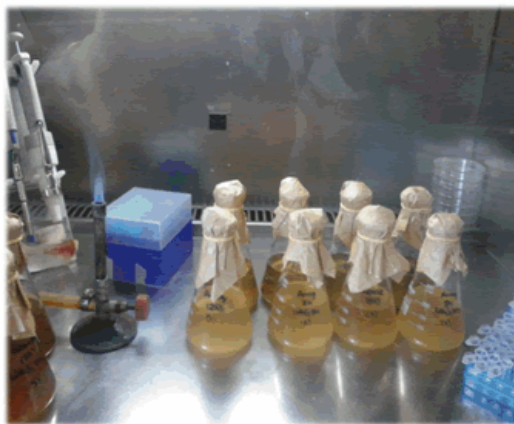


Farelo de Trigo

(b)



(c)



(d)

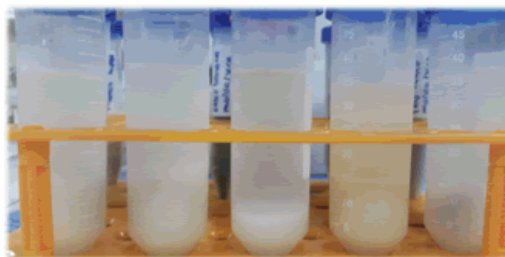


Figura B2 Etapas de cultivo em meio líquido (250 mL): (a) Biomassas selecionadas para hidrólise, (b) Hidrólise ácida das biomassas, (c) Cultivo em câmara de fluxo laminar e imagem de Agitador orbital durante os ensaios e (d) Etapas de extração com NaClO e acetona e biopolímero extraído

APÊNDICE B3
CULTIVOS DOS MICRORGANISMOS

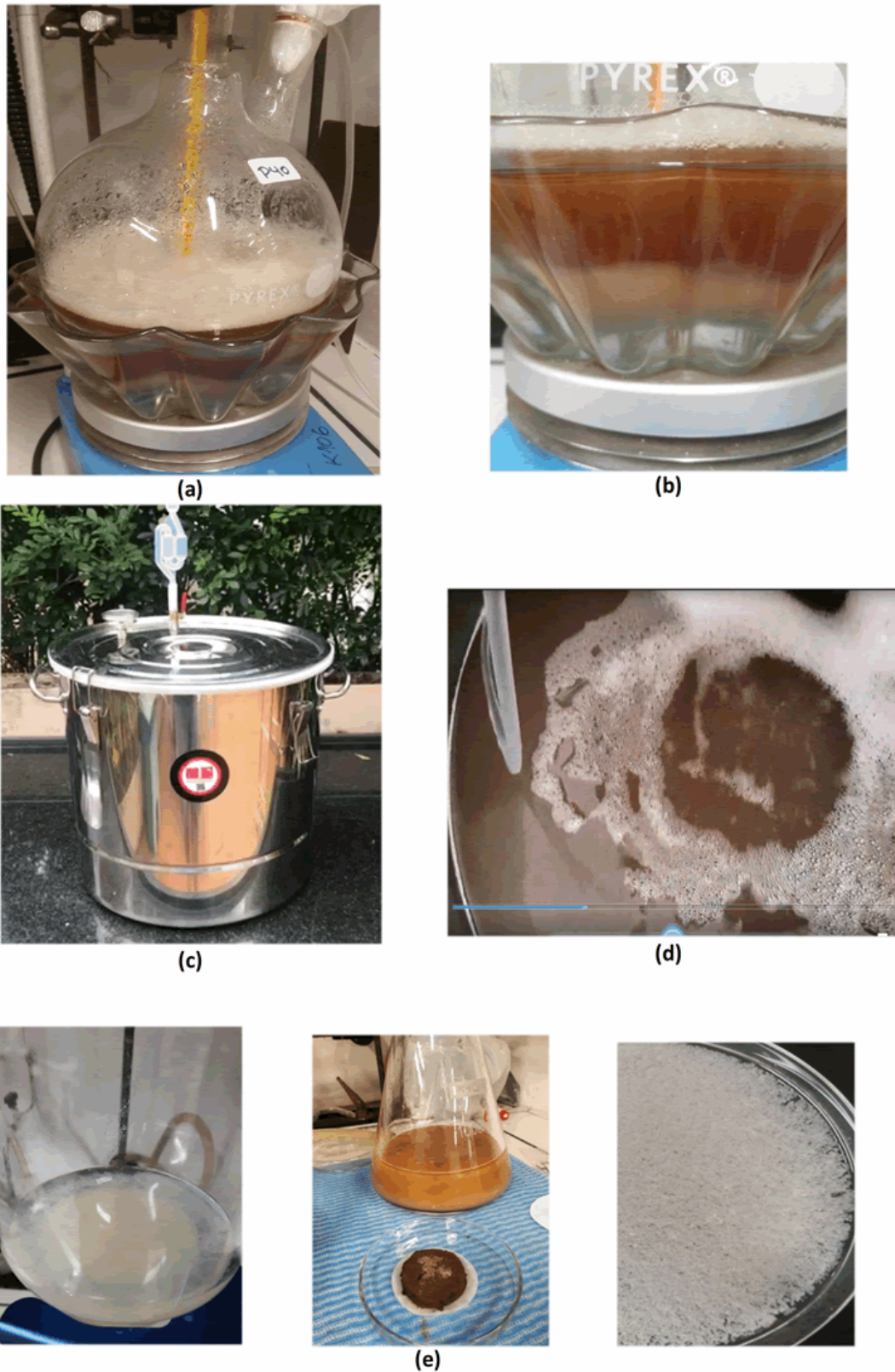


Figura B3 Cultivos em meio líquido: (a) Biorreator de 2 L, (b) Detalhe de acúmulo de biomassa durante o cultivo, (c) Biorreator de 46,5 L, (d) Detalhe do meio durante o cultivo em biorreator e (e) Etapas de extração do PHA com carbonato de polipropileno.

APÊNDICE C1

CURVAS DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS NOS DIFERENTES MEIOS

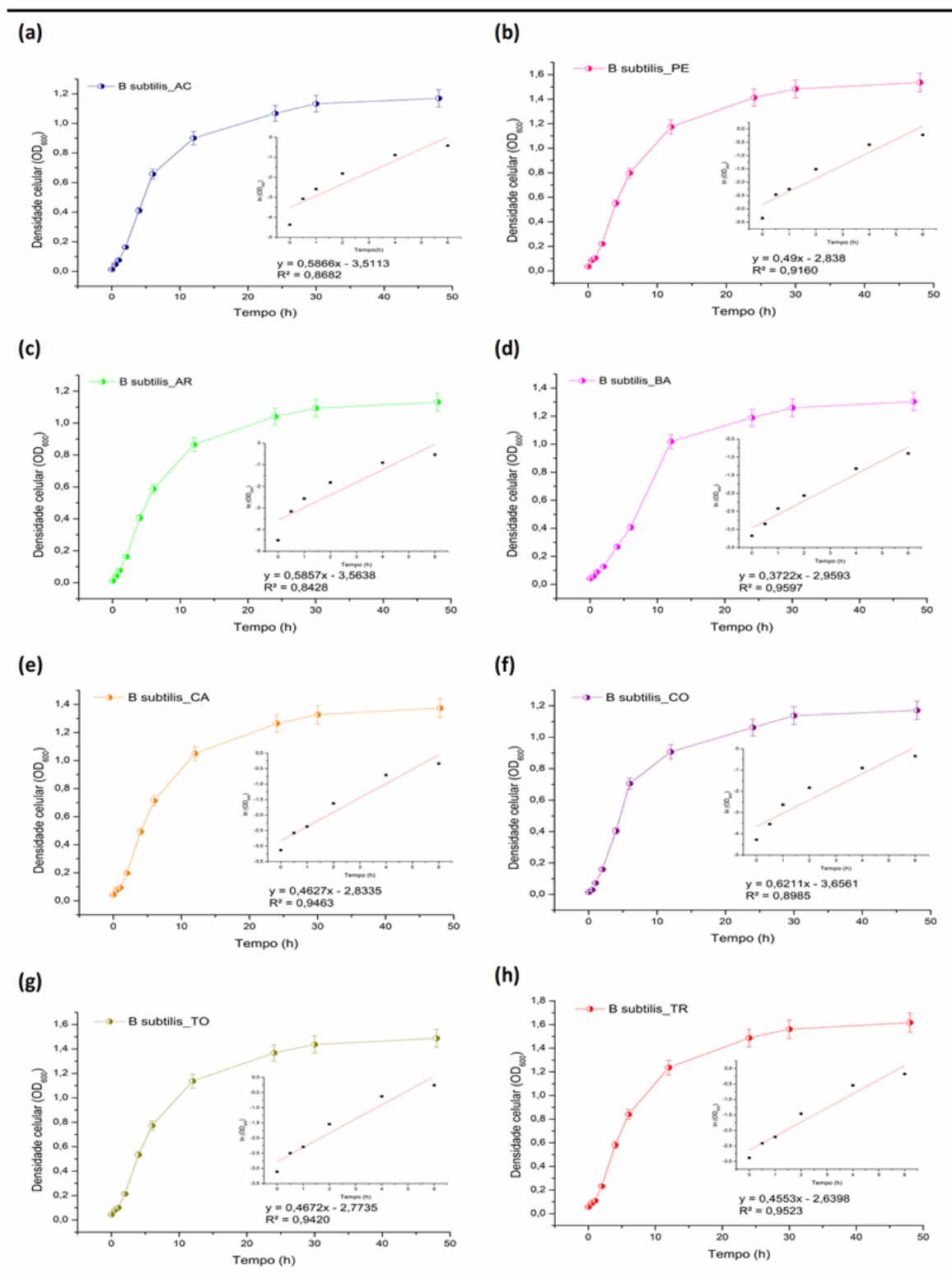


Figura C1 Curvas de crescimento de *Bacillus subtilis* em meios hidrolisados ácidos: (a) Casca de acácia, (b) Pele de amendoim, (c) Casca de arroz, (d) casca de banana, (e) Bagaço de cana, (f) Fibra de coco, (g) Taló de fumo e (h) Farelo de trigo.

APÊNDICE C2
CURVAS DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS NOS DIFERENTES MEIOS

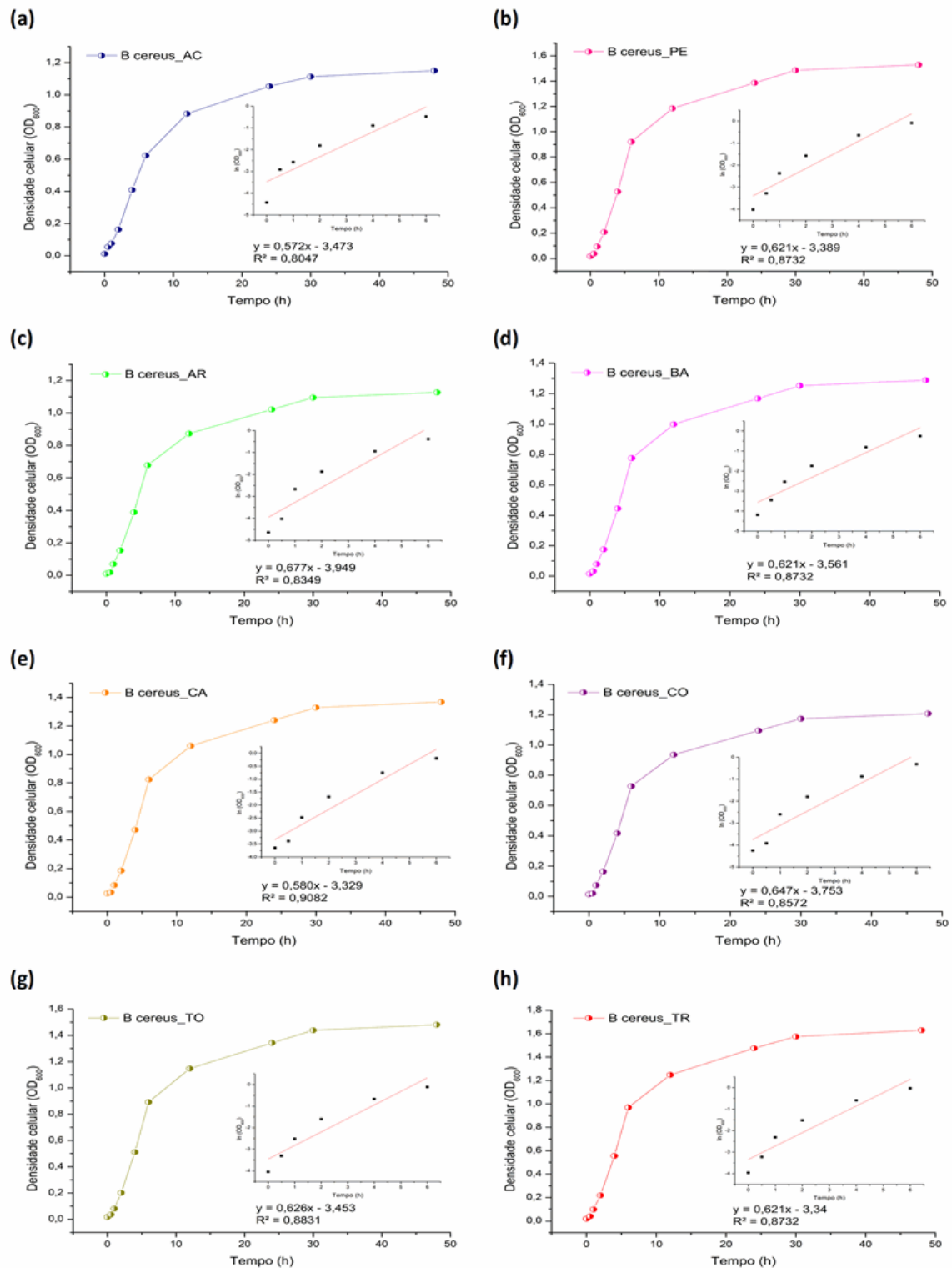


Figura C2 Curvas de crescimento de *Bacillus cereus* em meios hidrolisados ácidos: (a) Casca de acácia, (b) Pele de amendoim, (c) Casca de arroz, (d) casca de banana, (e) Bagaço de cana, (f) Fibra de coco, (g) Talo de fumo e (h) Farelo de trigo.

APÊNDICE C3
CURVAS DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS NOS DIFERENTES MEIOS

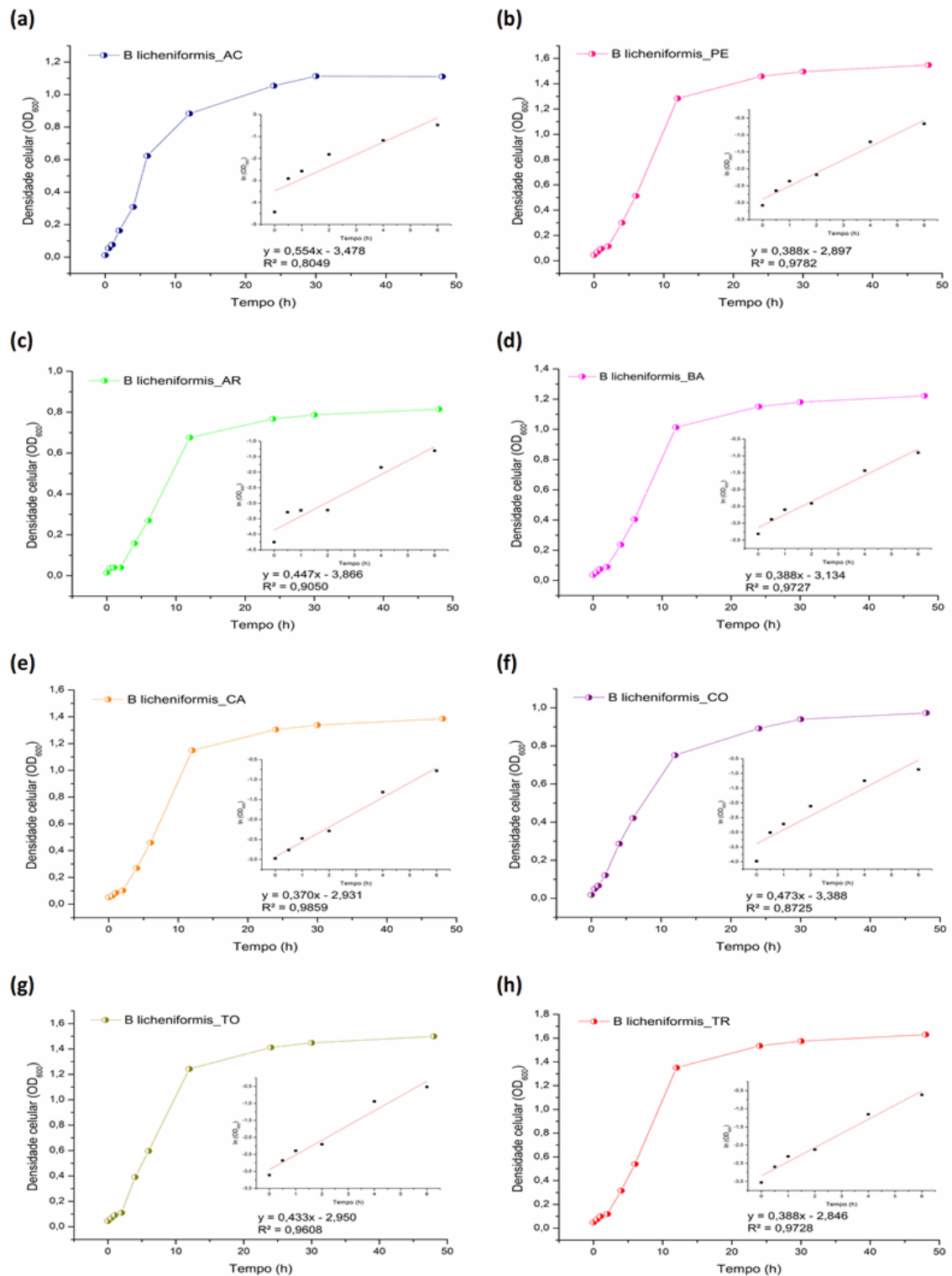


Figura C3 Curvas de crescimento de *Bacillus licheniformis* em meios hidrolisados ácidos: (a) Casca de acácia, (b) Pele de amendoim, (c) Casca de arroz, (d) casca de banana, (e) Bagaço de cana, (f) Fibra de coco, (g) Talo de fumo e (h) Farelo de trigo.

APÊNDICE C4

CURVAS DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS NOS DIFERENTES MEIOS

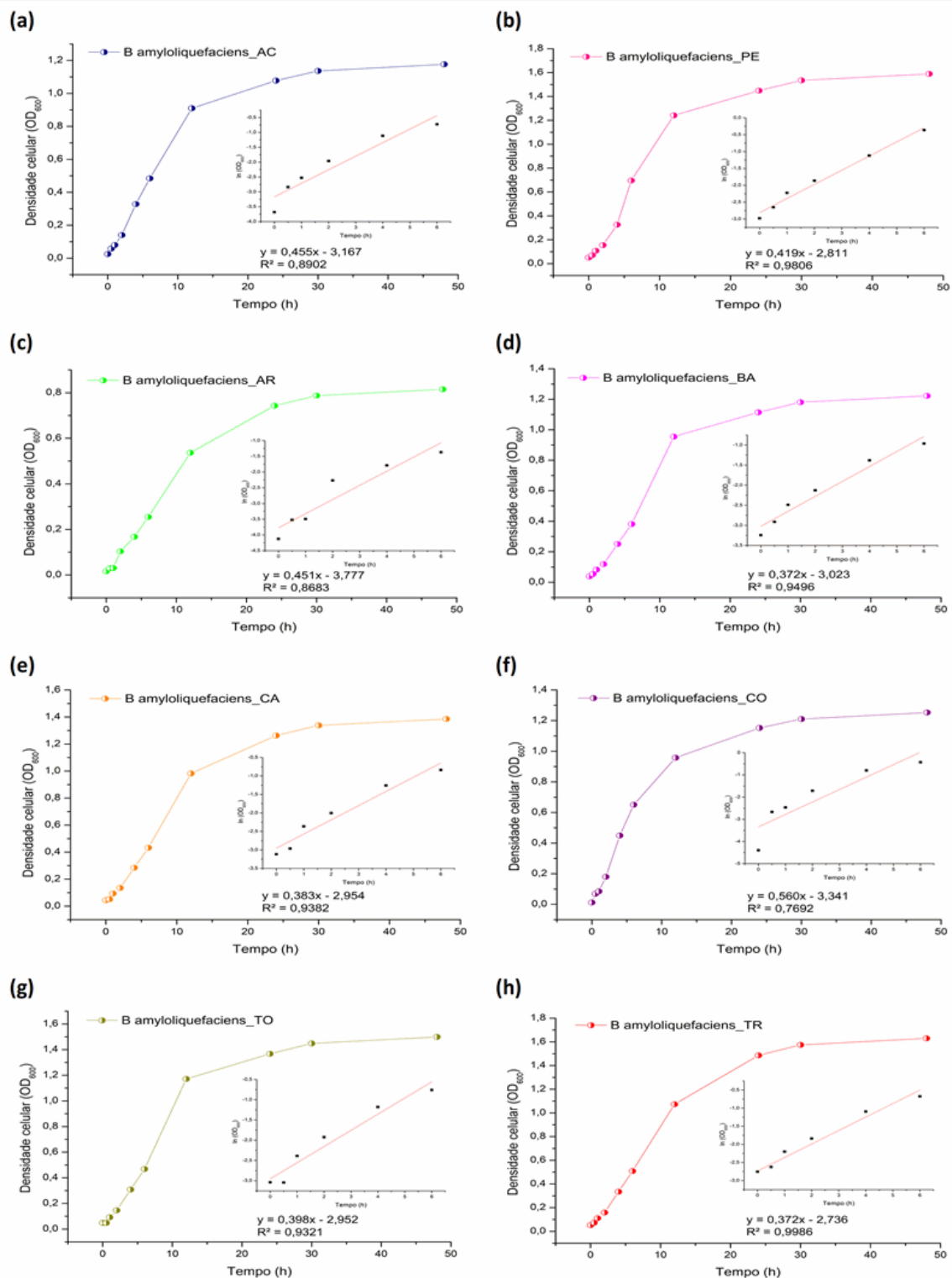


Figura C4 Curvas de crescimento de *Bacillus amyloliquefaciens* em meios hidrolisados ácidos: (a) Casca de acácia, (b) Pele de amendoim, (c) Casca de arroz, (d) casca de banana, (e) Bagaço de cana, (f) Fibra de coco, (g) Talo de fumo e (h) Farelo de trigo.

APÊNDICE D1 ÍNDICE DE CARBONILA

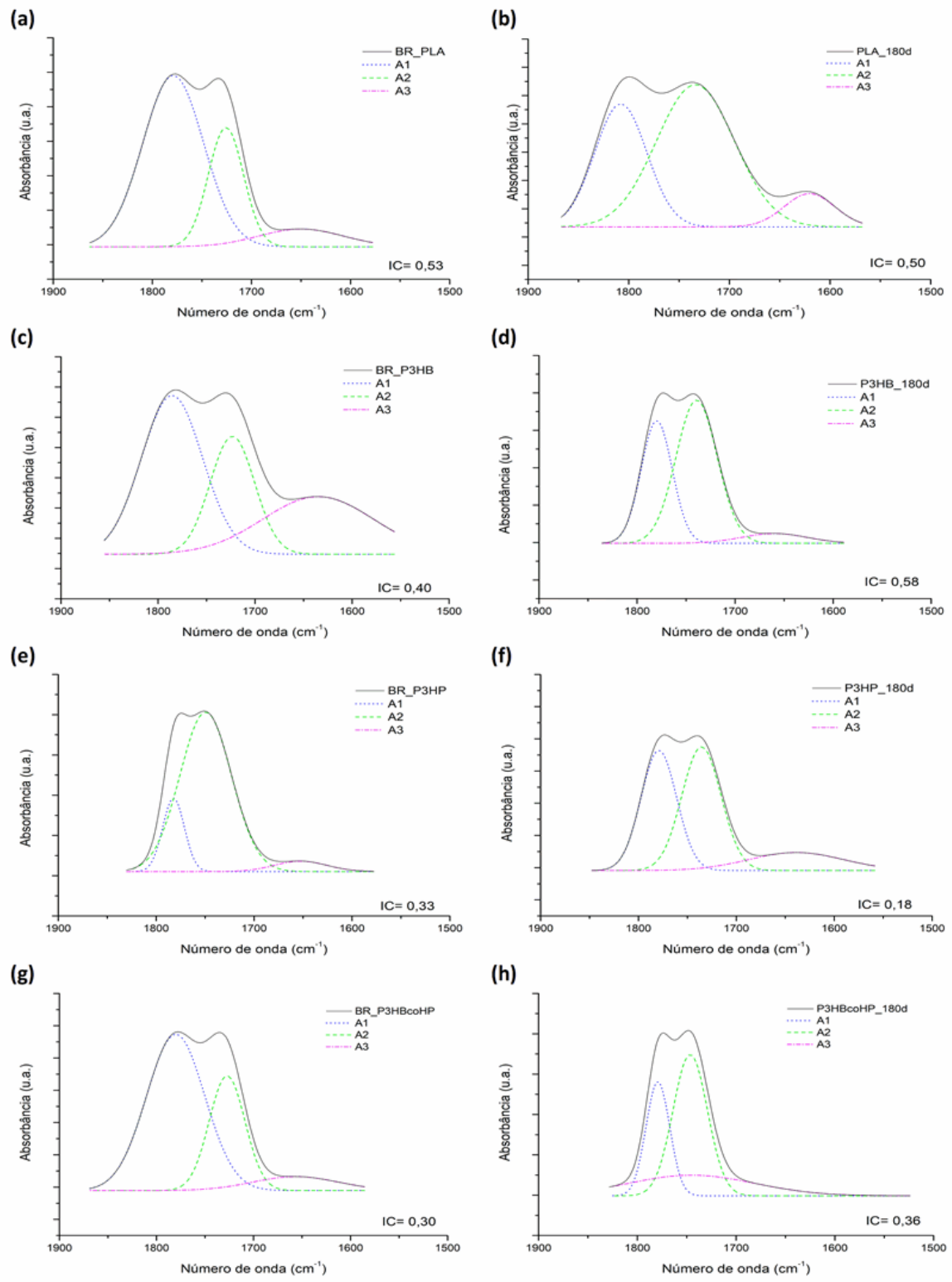


Figura D1 – Deconvolução das curvas obtidas por FTIR entre 1800 e 1500 cm^{-1} , início (BR) e após 180 dias (a) BR_PLA, (b) PLA_180d, (c) BR_P3HB, (d) P3HB_180d, (e) BR_P3HP, (f) P3HP_180d, (g) BR_P3HBcoHP e (h) P3HBcoHP_180d

APÊNDICE D2
ÍNDICE DE CARBONILA

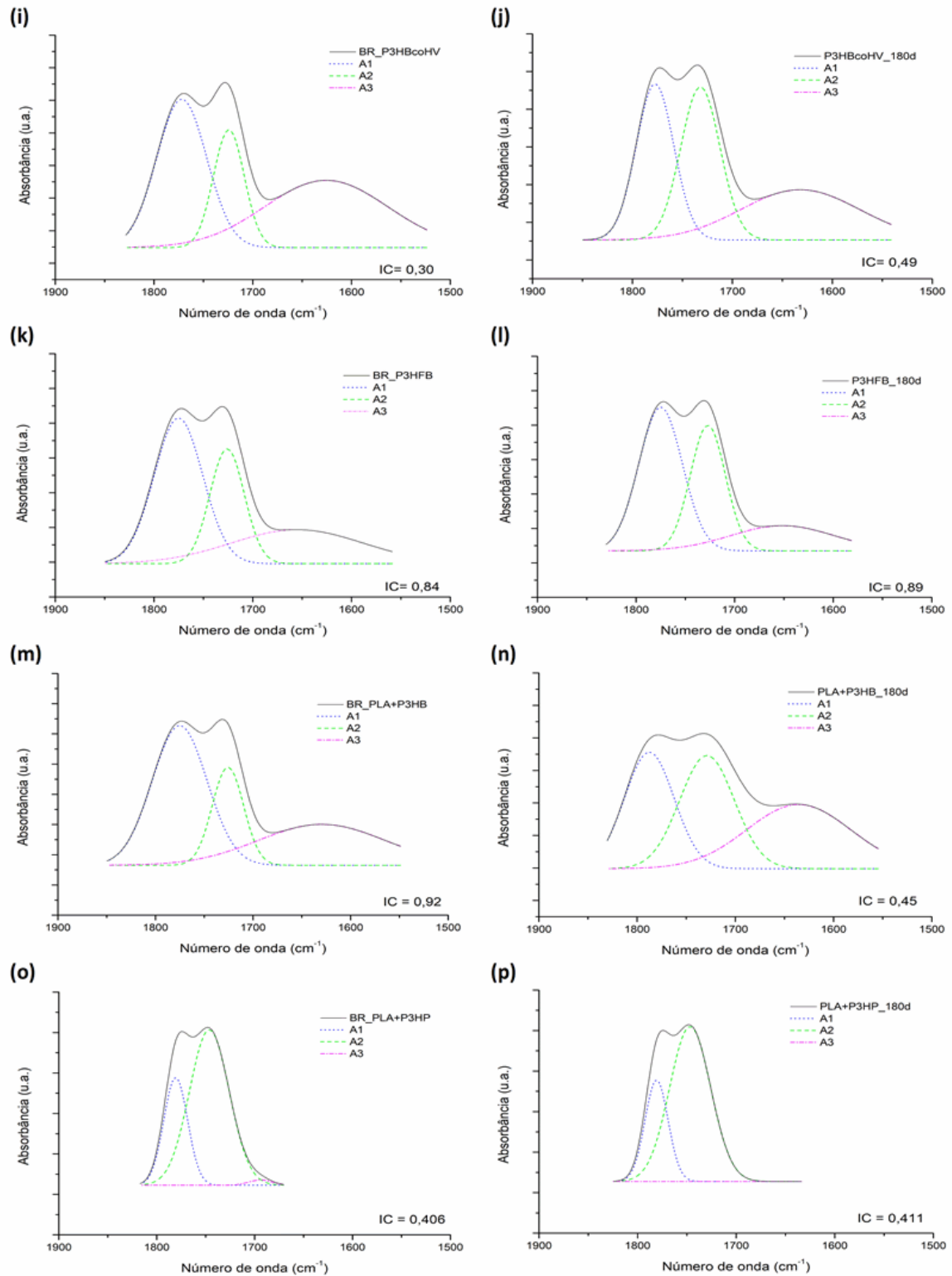


Figura D2 – Deconvolução das curvas obtidas por FTIR entre 1800 e 1500 cm^{-1} , início (BR) e após 180 dias (i) BR_P3HBcoHV, (j) P3HBcoHV_180d, (k) BR_P3HFB, (l) P3HFB_180d, (m) BR_PLA+P3HB, (n) PLA+P3HB_180d, (o) BR_PLA+P3HP e (p) PLA+P3HP_180d

APÊNDICE D3 ÍNDICE DE CARBONILA

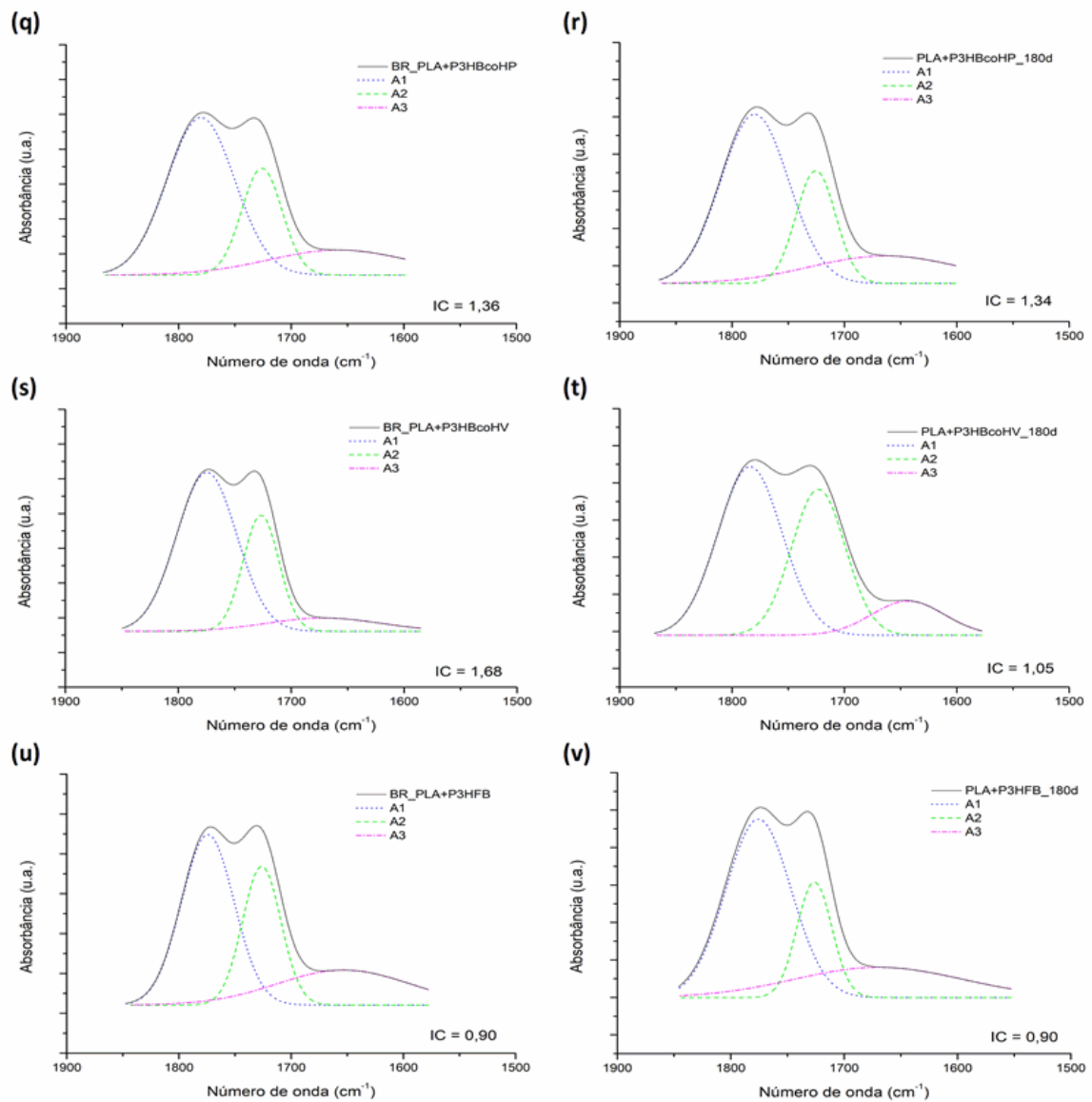
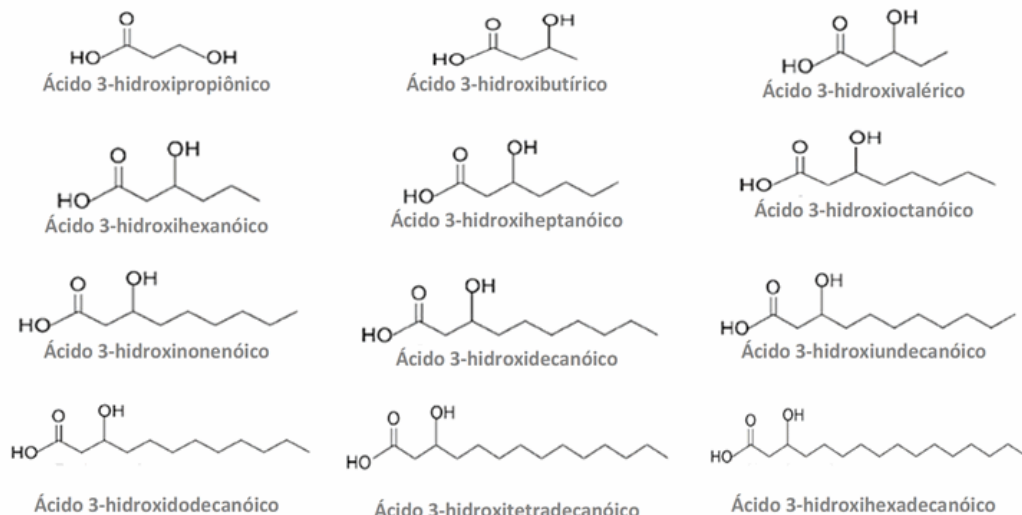


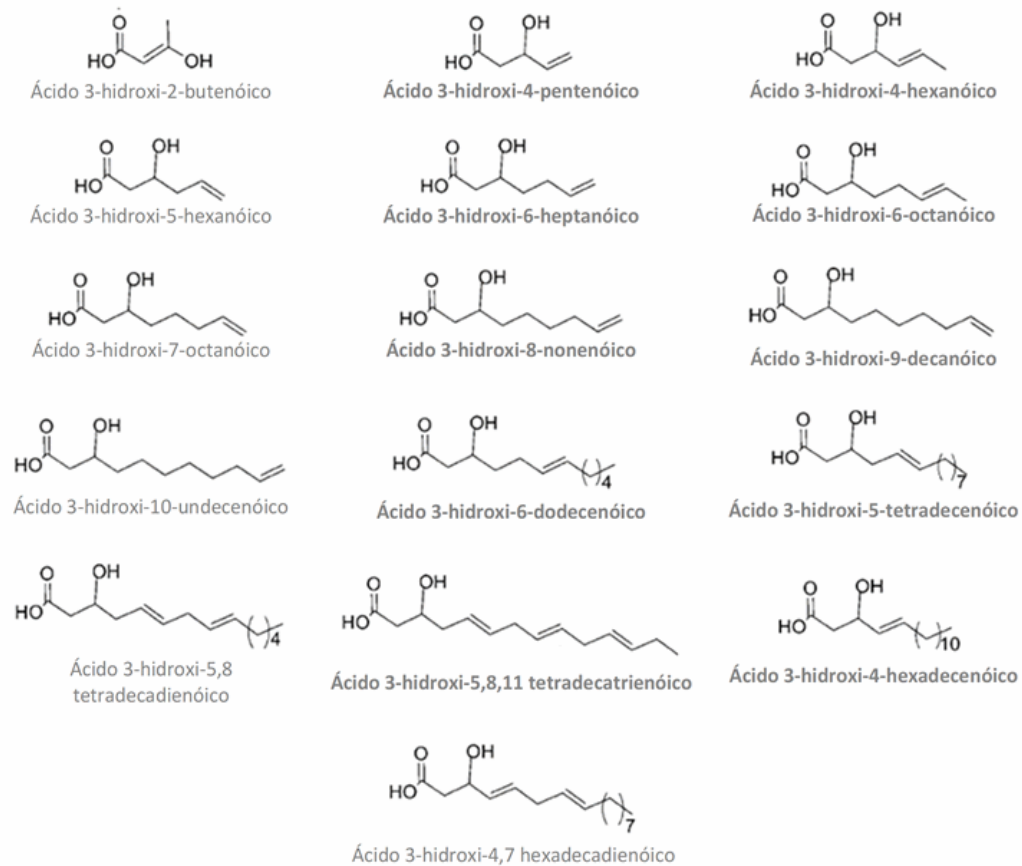
Figura D3 – Deconvolução das curvas obtidas por FTIR entre 1800 e 1500 cm⁻¹, início (BR) e após 180 dias (q) BR_PLA+P3HBcoHP, (r) PLA+P3HBcoHP_180d, (s) BR_PLA+P3HBcoHV, (t) PLA+P3HBcoHV_180d, (u) BR_PLA+P3HFB e (v) PLA+P3HFB_180d

ANEXO I
EXEMPLOS DE MONÔMEROS DE PHA SINTETIZADOS POR BACTÉRIAS

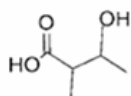
(I) 3-hidroxicanoatos



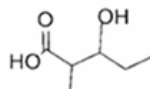
(II) 3-hidroxicenoatos



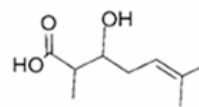
(III) 3-hidroxiálcanoatos ramificados com grupos metila



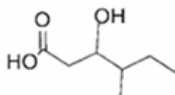
Ácido 3-hidroxi-2-metil butírico



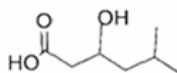
Ácido 3-hidroxi-2-metilvalérico



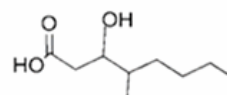
Ácido 3-hidroxi-2,6 metil-5-heptanóico



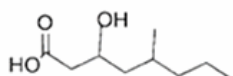
Ácido 3-hidroxi-4-metil hexanóico



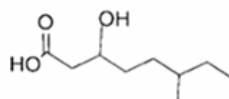
Ácido 3-hidroxi-5-metil hexanóico



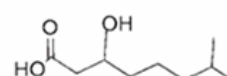
Ácido 3-hidroxi-4-metil octanóico



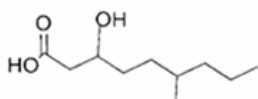
Ácido 3-hidroxi-5-metil octanóico



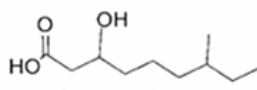
Ácido 3-hidroxi-6-metil octanóico



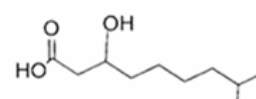
Ácido 3-hidroxi-7-metil octanóico



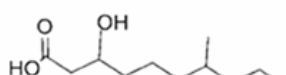
Ácido 3-hidroxi-6-metilnonanóico



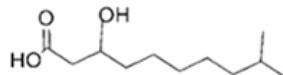
Ácido 3-hidroxi-7-metilnonanóico



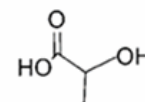
Ácido 3-hidroxi-8-metilnonanóico



Ácido 3-hidroxi-7-metildecanóico

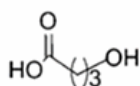


Ácido 3-hidroxi-9-metildecanóico

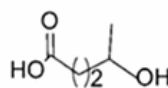


** Ácido láctico

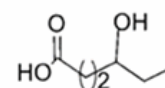
(IV) 4,5 hidroxialcanoatos



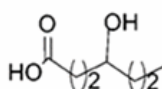
Ácido 4-hidroxi-butírico



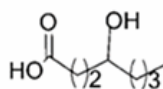
Ácido 4-hidroxi-valérico



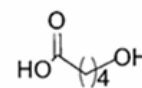
Ácido 4-hidroxi-hexanóico



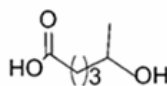
Ácido 4-hidroxi-heptanóico



Ácido 4-hidroxi-octanóico

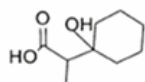


Ácido 5-hidroxi-valérico

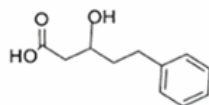


Ácido 5-hidroxi-hexanóico

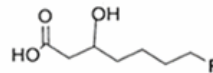
(V) 3-hidroxiacanoatos com diferentes grupos funcionais



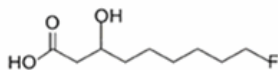
Ácido 3-hidroxi-ciclohexilbutírico



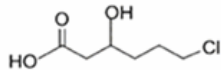
Ácido 3-hidroxi-5-Fenilvalérico



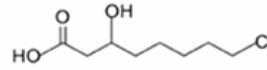
Ácido 3-hidroxi-7-Fluorheptanoico



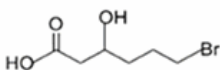
Ácido 3-hidroxi-9-Fluornonanoico



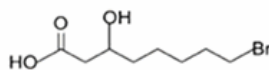
Ácido 3-hidroxi-6-Clorohexanoico



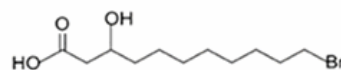
Ácido 3-hidroxi-8-Clorooctanoico



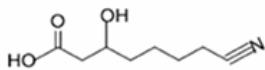
Ácido 3-hidroxi-6-Bromohexanoico



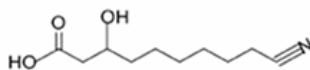
Ácido 3-hidroxi-8-Bromooctanoico



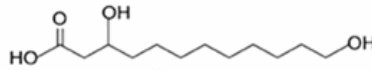
Ácido 3-hidroxi-11-Bromoundecanoico



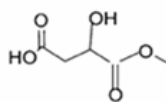
Ácido 3-hidroxi-7-Cianoheptanoico



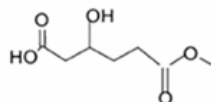
Ácido 3-hidroxi-9-Cianononanoico



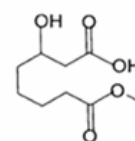
Ácido 3-hidroxi-12-hidroxidodecanoico



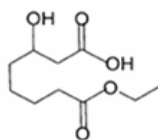
Ácido 3-hidroxi-succínico-metil éster



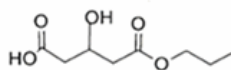
Ácido 3-hidroxi-adípico-metil éster



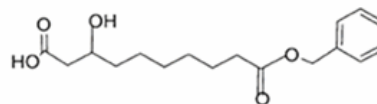
Ácido 3-hidroxi-subérico-metil éster



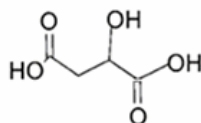
Ácido 3-hidroxi-subérico-etil éster



Ácido 3-hidroxi-pimélico-propil éster



Ácido 3-hidroxi-sebácico-benzil éster



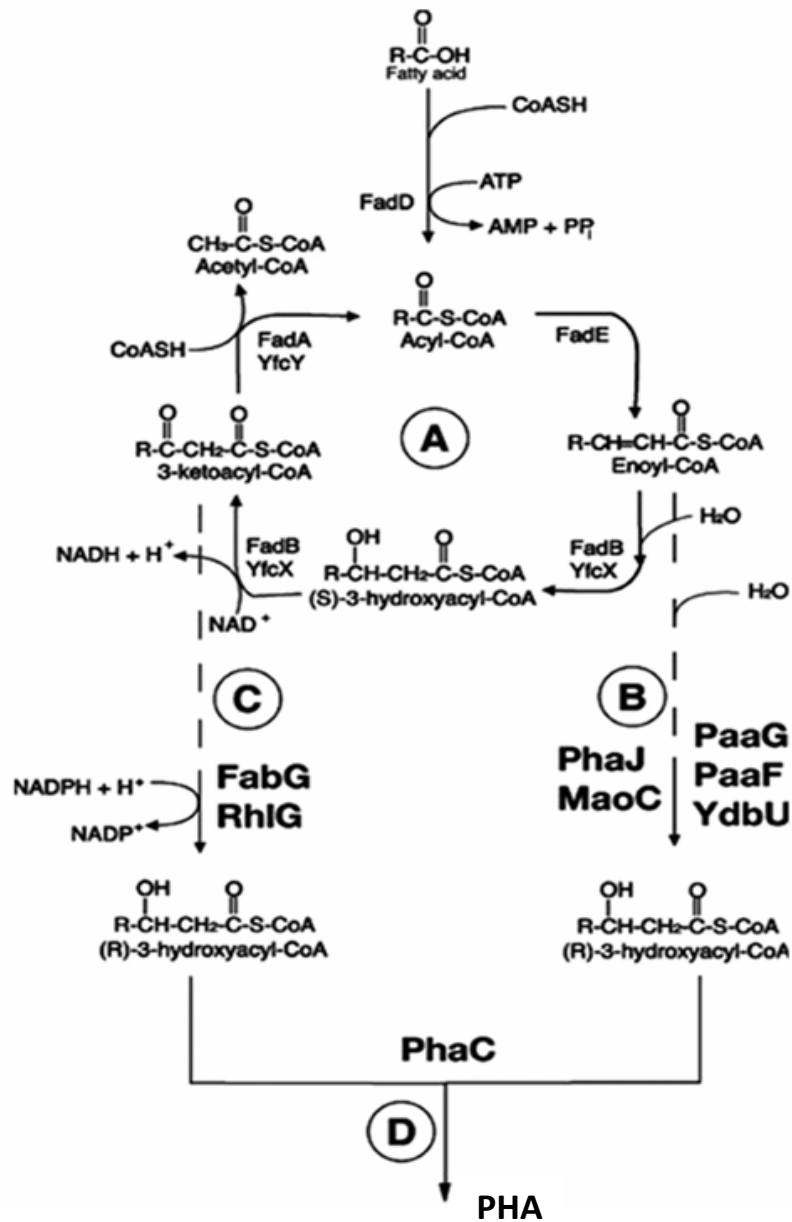
Ácido málico

Fonte: Estruturas de monômeros de PHA compilados das referências:

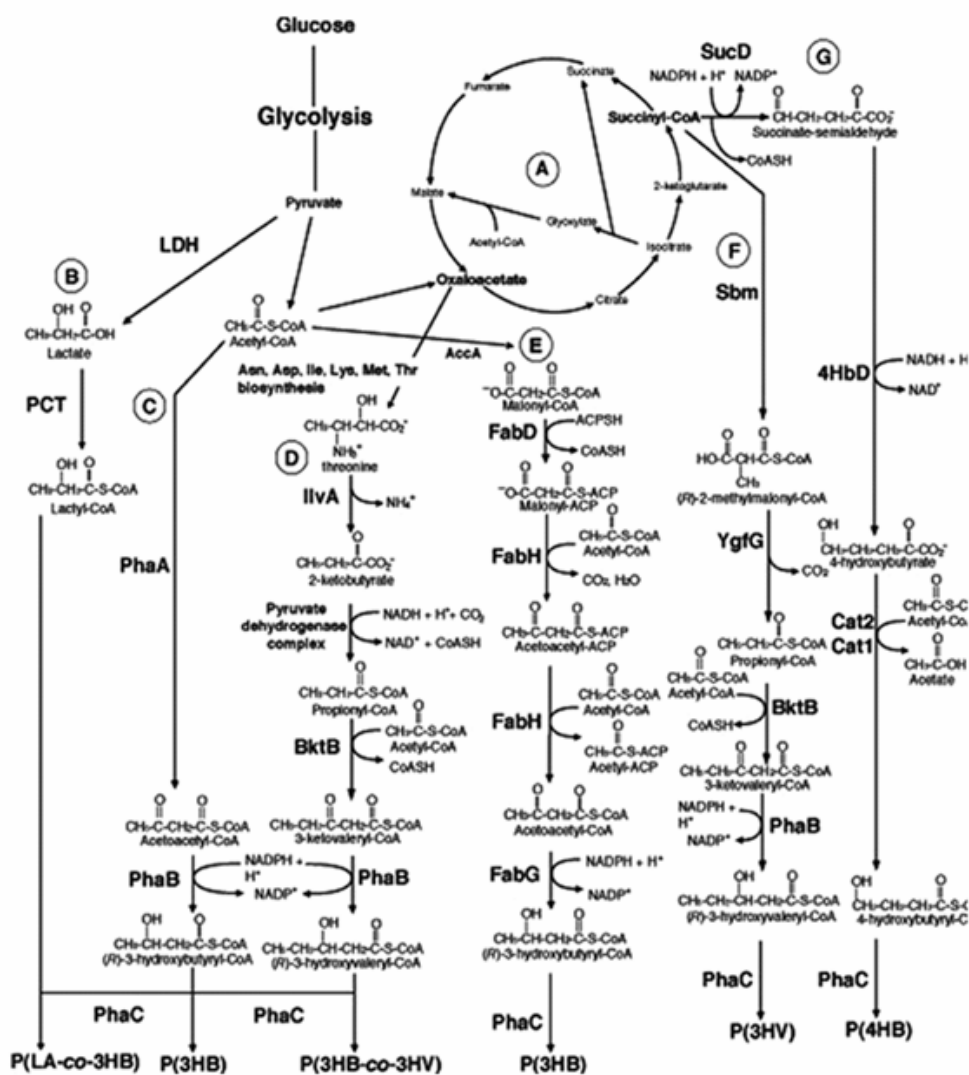
Lu, J., Tappel, R. C., & Nomura, C. T. (2009). Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). *Polymer Reviews*, 49(3), 226–248. doi:10.1080/15583720903048243.

Schmidell, Willibaldo; Lima, Urgel de Almeida; Aquarone, Eugênio; Borzani, W. *Biocologia Industrial*, volume 3, Edgard Blücher Ltda., 2019.

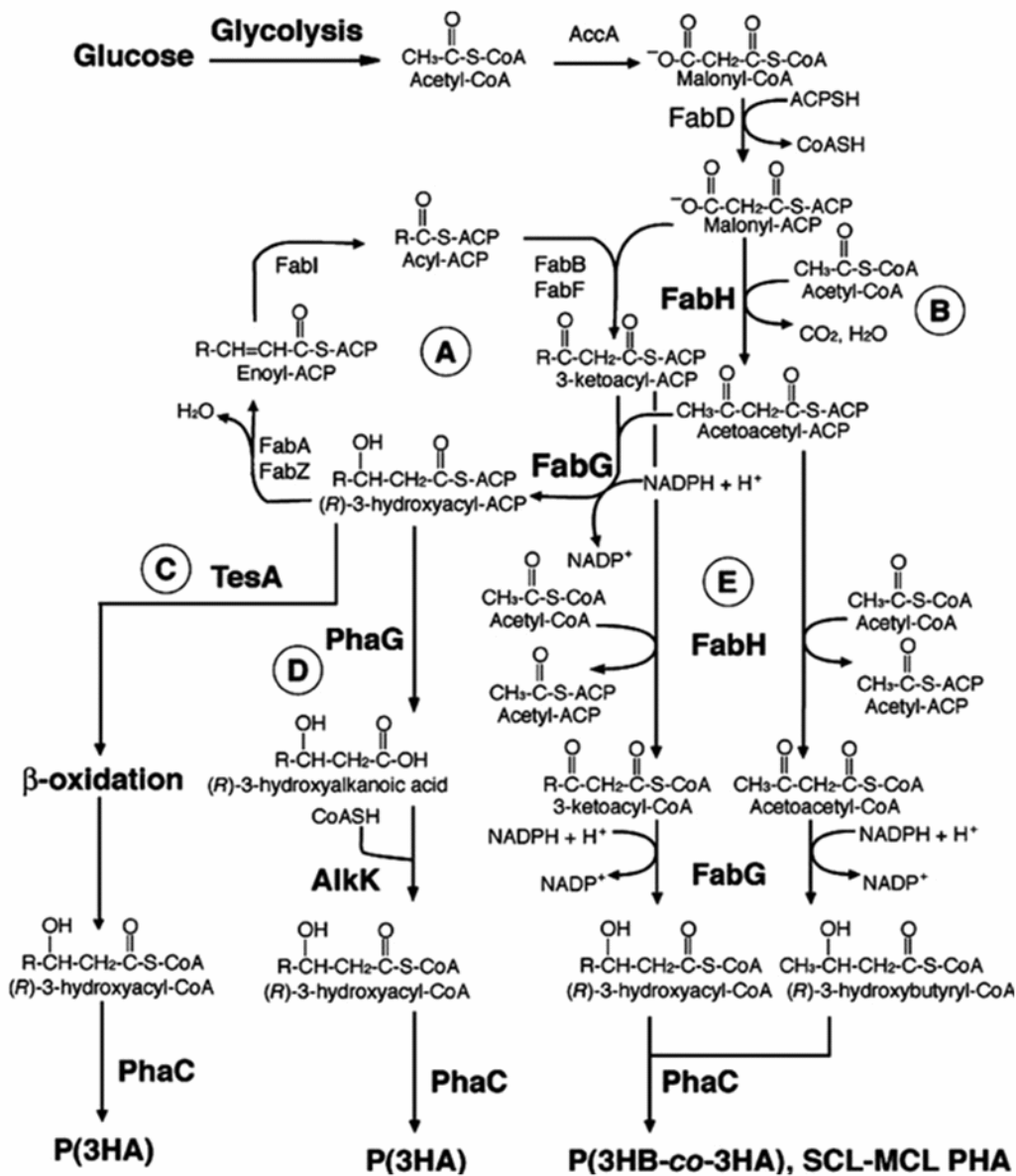
ANEXO II
PRINCIPAIS ROTAS METABÓLICAS PARA PRODUÇÃO DE PHA POR BACTÉRIAS



Rota 1 - β -oxidação e produção de PHA: (A) Via de oxidação β bacteriana. Os ácidos graxos são convertidos em substratos de acil-CoA graxos pela acil-CoA sintetase (FadD) de maneira dependente de ATP. O acil-CoA graxo é oxidado pela acil-CoA desidrogenase (FadE, YafH). A seguir, o 2-enoil-CoA é hidratado pela enoil-CoA hidratase (FadB) para produzir S - 3-hidroxiacil-CoA, que é subsequentemente oxidado a 3-cetoacil-CoA. FadA atua como uma 3-cetoacil-CoA tiolase e libera acetil-CoA resultando em um acil-CoA graxo que é 2 C mais curto. (B) Em cepas deficientes em FadB, YfcX, PaaG, PaaF e YdbH podem produzir monômeros para a produção de PHA. Além disso, enoil hidratases específicas de R, como PhaJ e MaoC, podem interceptar intermediários enoil-CoA da oxidação de ácidos graxos para produzir monômeros de PHA. (C) 3-cetoacil redutases como FabG e RhIG podem interceptar intermediários 3-cetoacil-CoA para produzir monômeros R -3-hidroxiacil-CoA para produção de PHA (D).



Rota 2 - Vias de produção de SCL-PHA a partir da glicose como fonte de carbono. PhaC representa PHA sintase em todas as vias e catalisa a polimerização de monômeros em polímeros PHA. **(A)** Ciclo do ácido tricarboxílico. **(B)** Via sintética para a produção de monômeros lactil-CoA. LDH, lactato desidrogenase; PCT, propionil-CoA transferase. **(C)** Via (s) derivada (s) de *Ralstonia eutropha* para a produção de 3-hidroxibutiril-CoA (3HB-CoA). PhaA, cetotiolase; PhaB, cetoreductase. **(D)** Via para a produção de 3-hidroxivaleril-CoA (3HV-CoA). IlvA; treonina desaminase, BktB; cetotiolase. **(E)** Via para a produção de 3HB-CoA a partir da biossíntese de ácidos graxos. AccA, acetil-CoA carboxilase; FabD, malonil-CoA: ACP transacilase; FabH, 3-cetoacil-ACP sintase III; FabG, 3-cetoacil-ACP redutase. **(F)** Via sintética alternativa de 3HV. Sbm, mutase da bela adormecida; YgfG, metilmalonil-CoA descarboxilase; BktB, cetotiolase. **(G)** Caminho para a produção de 4-hidroxibutiril-CoA. SucD, succinato desidrogenase; 4HbD, 4-hidroxibutirato desidrogenase; Cat2, Cat1, 4-hidroxibutirato transferase.



Rota - 3 Vias de produção de MCL-PHA a partir da glicose como fonte de carbono. (A) Biossíntese de ácidos graxos dissociados. **(B)** Reação de condensação de FabH de tipo selvagem. **(C)** Via dependente de tioesterasas (Tes) para a produção de 3-hidroxiacil-CoA. **(D)** Via de fornecimento de monômero mcl-PHA específico de 3-hidroxiacil-ACP tioesterase (PhaG) e acil-CoA sintetase. **(E)** FabH projetado, via de fornecimento de monômero PHA de scl-mcl mediada por FabG.

Fonte: Nomura, C.T.; Taguchi, S. PHA synthase engineering toward superbicatalysts for custom-made biopolymers. Appl Microbiol Biotechnol (2007) 73:969-979, DOI: 10.1007/s00253-006-0566-4

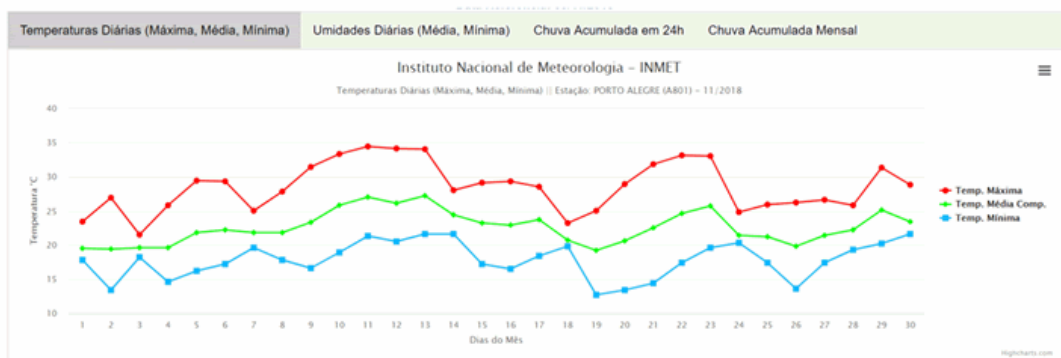
ANEXO III
COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PHA

Método de Extração	Vantagens	Desvantagens	Referência
Solvente halogenado	Remove endoxinas, alta pureza, geralmente mantém a massa molecular intacta	Riscos relacionados a solventes halogenados, alto custo, quebra a estrutura dos grânulos de PHA	Jiang et. al, 2006 Yang, 2011
Solventes orgânicos	Boa recuperação, alta pureza, alta massa molecular	Não reciclável, tóxico	Aramvash, 2015,2016,2018
Solventes não halogenados	Ambientalmente saudável, não tóxico, reciclável e reusável	Baixo rendimento de recuperação em larga escala	Fei et. al, 2016 Jiang et. al, 2018 Gahlawat and Soni, 2019
Digestão com surfactantes	Polímero extraído mantém a massa molecular e morfologia original	Baixa pureza e necessita tratamento de água residual	Kim et. al, 2003 Mannina et. al, 2019
Digestão com NaOCl	Alta pureza do PHA	Degradação do polímero	Villano et. al, 2004
NaOCl e clorofórmio	Baixa degradação do polímero, alta pureza	Necessária grande quantidade de solvente	Ryu et. al, 2000
NaOCl e surfactantes	Degradação limitada, baixo custo operacional	Grande volume de água residual	Dong e Sun, 2000
Digestão Ácida (H₂SO₄)	Define propriedades mecânicas do PHA	Problemas de toxicidade	López-Abelairas et. al, 2015
Digestão mecânica	Nenhum químico é usado, ambientalmente favorável	Demorado	Arikawa et. al, 2017
Digestão enzimática	Boa recuperação, ambientalmente favorável	Alto custo das enzimas, processo complexo	Lakshman e Shamala, 2006 Kachrimanidou et. al, 2016
Digestão biológica	Nenhum químico é usado, baixo custo operacional, preservação da massa molecular, economia de energia	Pode manter a presença de debris celulares e endotoxinas	Martinez et. al, 2013; Murugan et. al, 2016 Ong et al, 2018
Liberção espontânea	Não necessita nenhum químico para extração	Baixa recuperação (cerca de 80% das células secretam o PHB espontaneamente)	Jung et. al, 2005
Flotação de ar dissolvido	Nenhum químico é usado	Requer algumas etapas de flotação em sequência	Van Hee et. al, 2006
Extração aquosa em duas fases	Seguro para biomateriais sensíveis, ambientalmente saudável, fácil escalonamento	NR	Yeh e Lan, 2014 Leong et. al, 2018
Lise controlada	Baixo custo de recuperação, alta pureza	Baixa recuperação	Martínez et. al, 2011 Israni et. al, 2018
Secreção de grânulos de PHA	Baixo custo de processamento	Secreção parcial do PHA	Rahmann et. al, 2013
Extração “ponto de nuvem”	Reusabilidade dos componentes formados, alta recuperação	Qualidade do produto afetada	Leong et. al, 2017

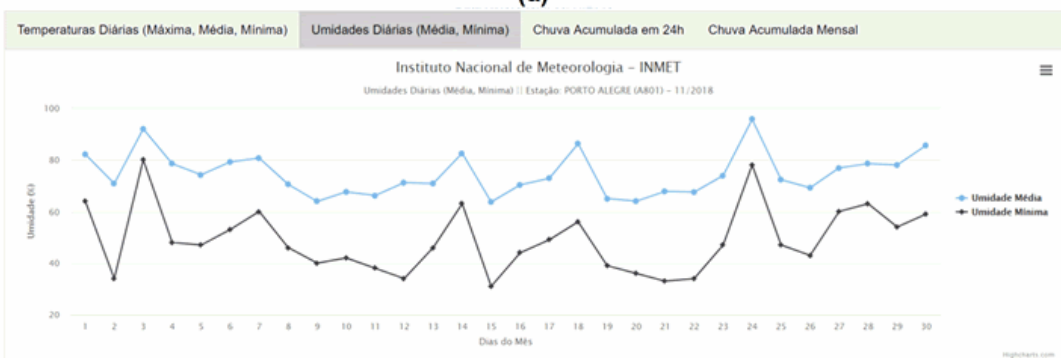
Fonte: Polyhydroxyalkanoates Biopolymers - Production Strategies, Geeta Gahlawat, em: SpringerBriefs in Molecular Science - Biobased Polymers, Capítulo 4, pág. 54 e 55, disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-33897-8>

ANEXO IV

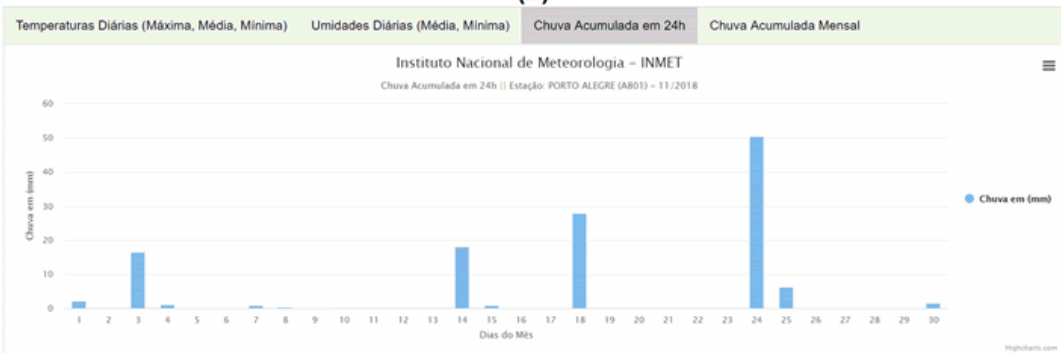
Dados INMET: Temperatura, Umidade, Chuva acumulada e Radiação



(a)



(b)

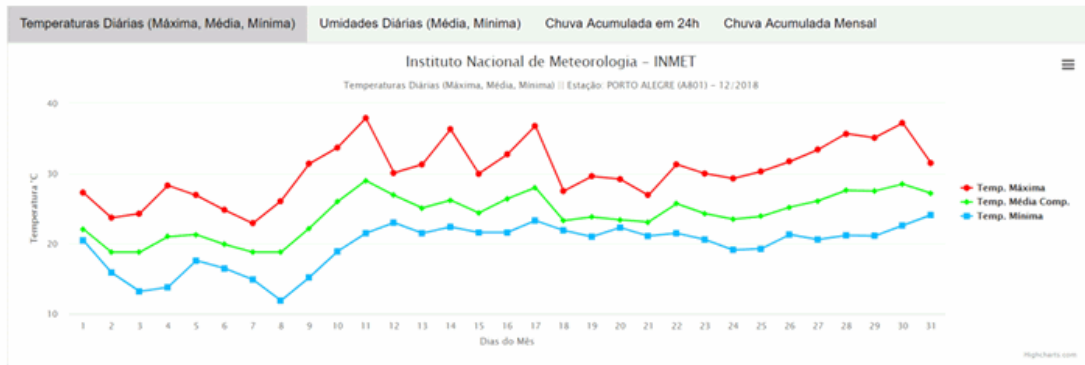


(c)

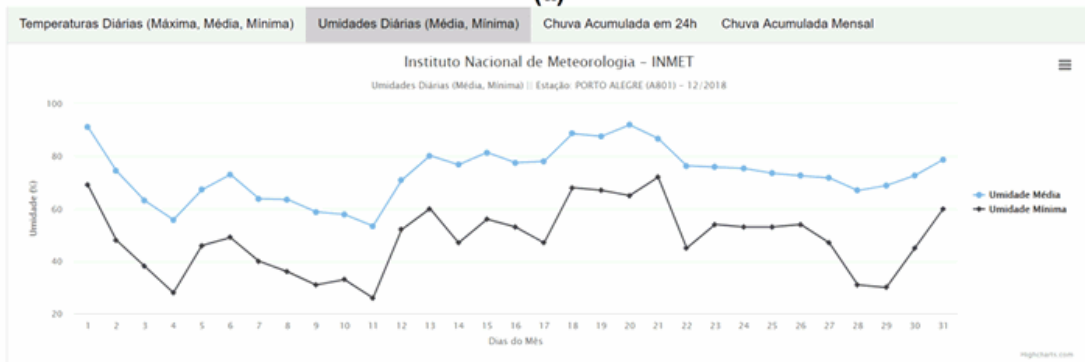


(d)

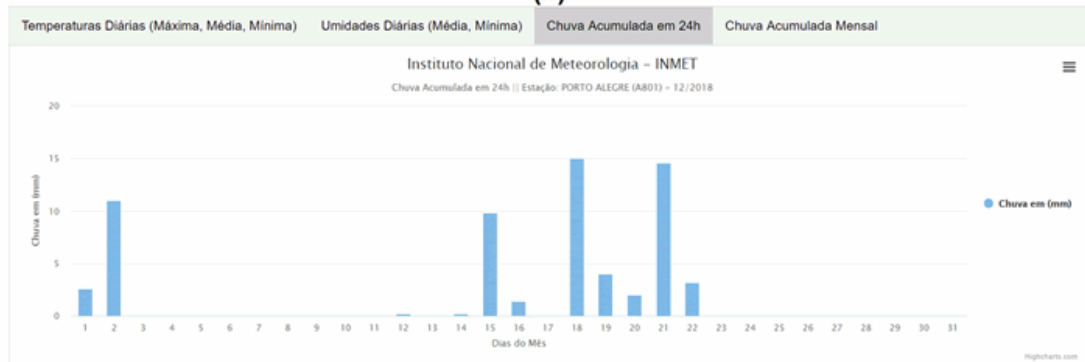
Dados meteorológicos referentes ao mês de Novembro/2018: (a) Temperaturas diárias (máxima, média, mínima), (b) Umidades diárias (média e mínima), (c) Chuva acumulada (mm) e (d) Radiação solar diária



(a)



(b)

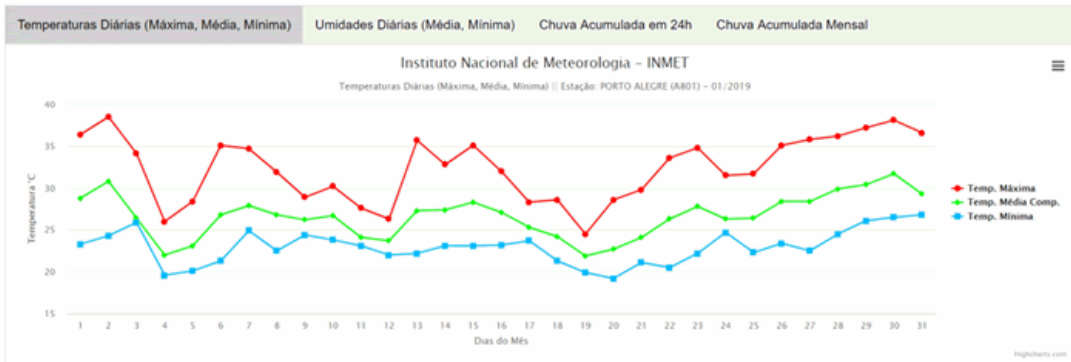


(c)

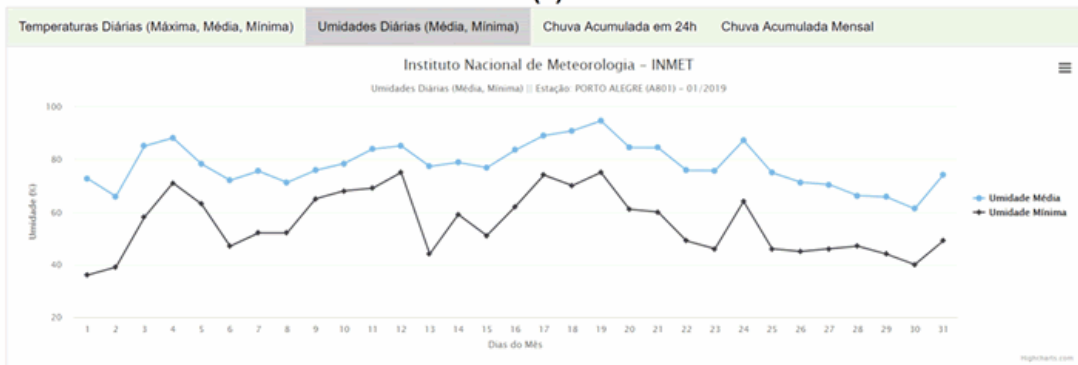


(d)

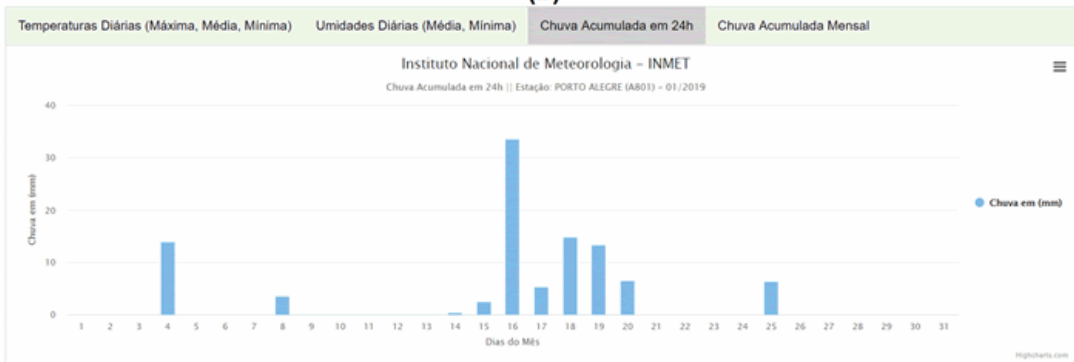
Dados meteorológicos referentes ao mês de Dezembro/2018: (a) Temperaturas diárias (máxima, média, mínima), (b) Umidades diárias (média e mínima), (c) Chuva acumulada (mm) e (d) Radiação solar diária



(a)



(b)

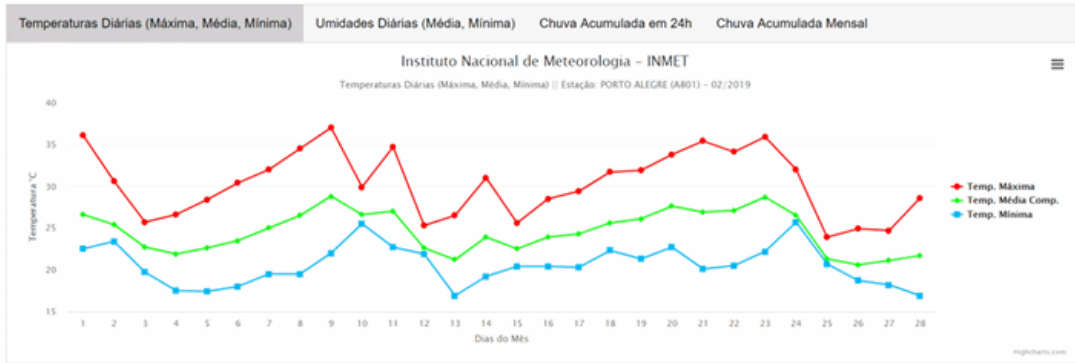


(c)

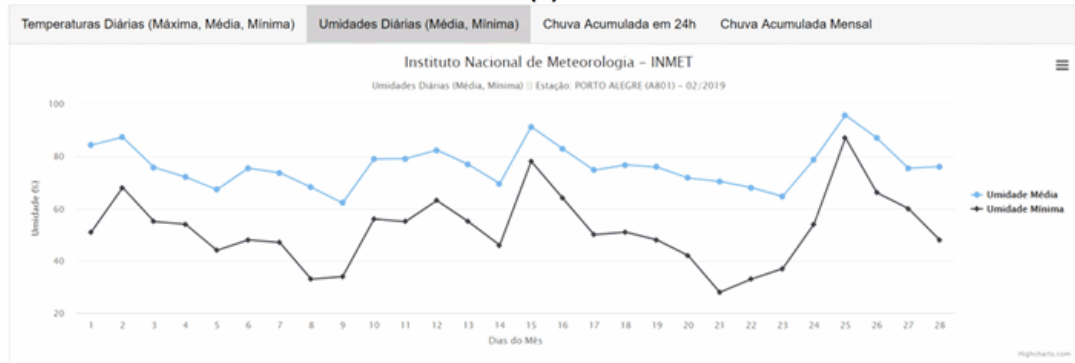


(d)

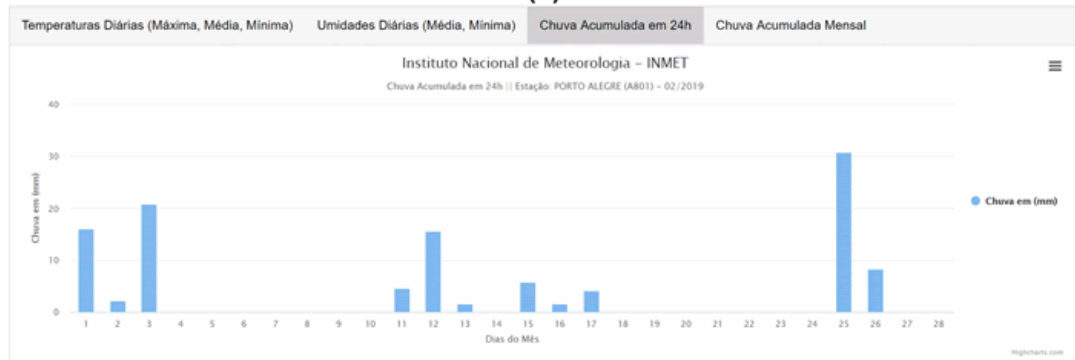
Dados meteorológicos referentes ao mês de Janeiro/2019: (a) Temperaturas diárias (máxima, média, mínima), (b) Umidades diárias (média e mínima), (c) Chuva acumulada (mm) e (d) Radiação solar diária



(a)



(b)

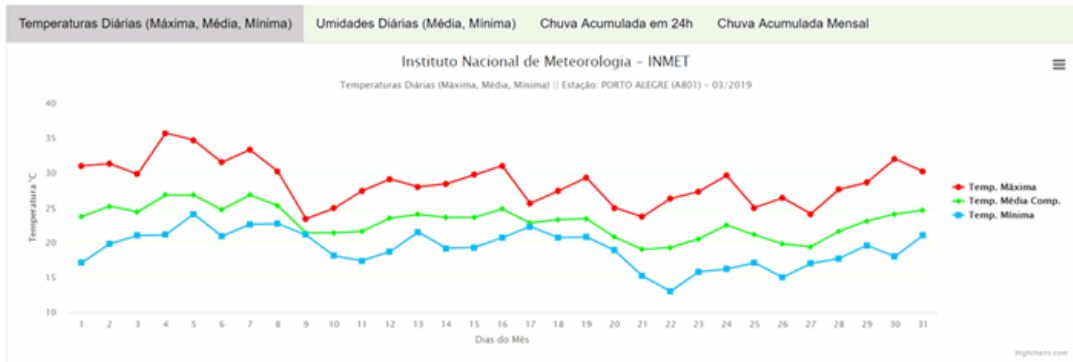


(c)

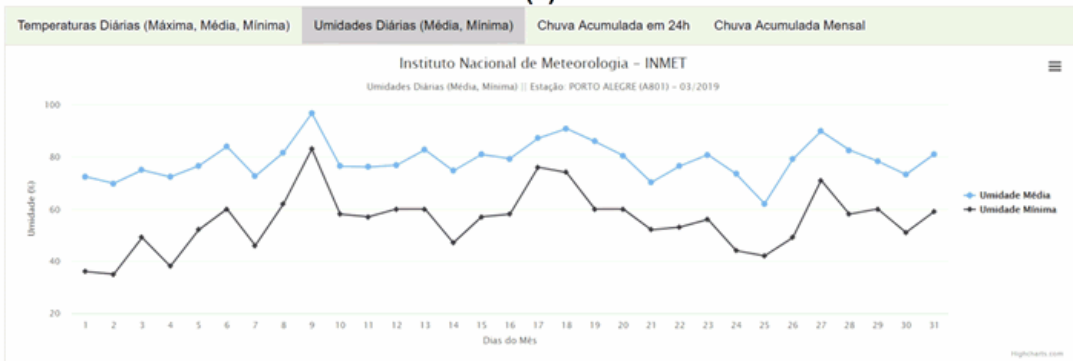


(d)

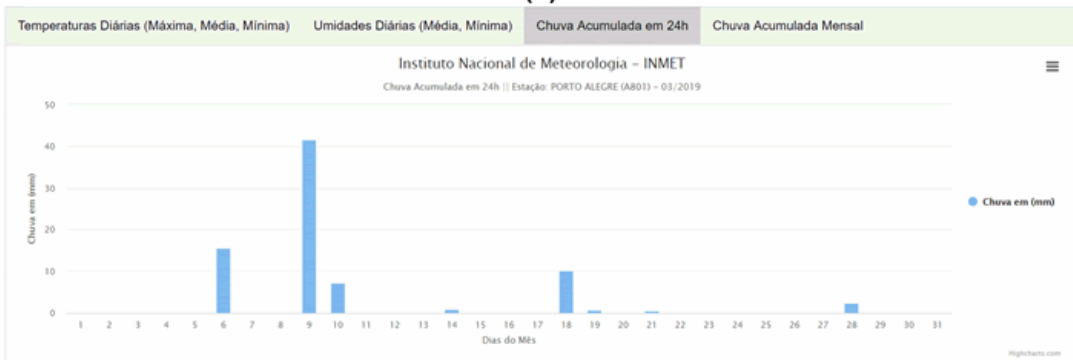
Dados meteorológicos referentes ao mês de Fevereiro/2019: (a) Temperaturas diárias (máxima, média, mínima), (b) Umidades diárias (média e mínima), (c) Chuva acumulada (mm) e (d) Radiação solar diária



(a)



(b)

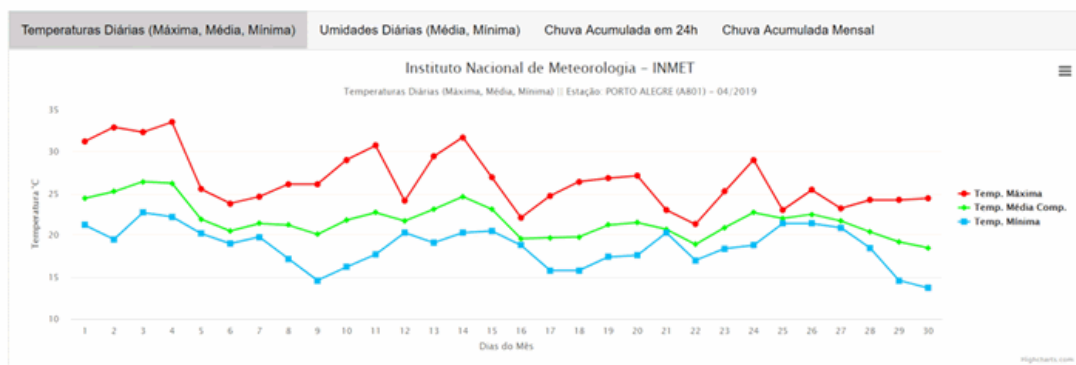


(c)

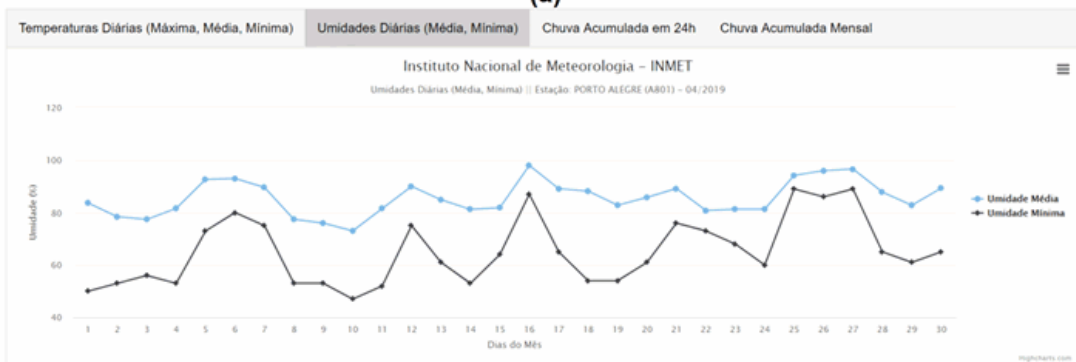


(d)

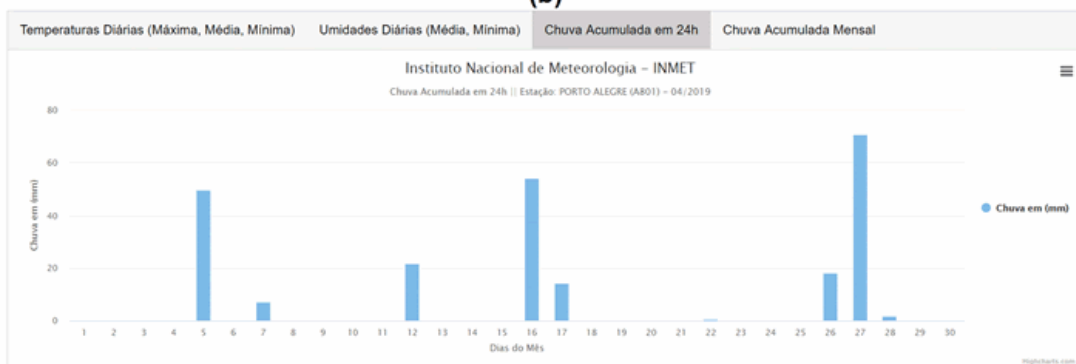
Dados meteorológicos referentes ao mês de Março/2019: (a) Temperaturas diárias (máxima, média, mínima), (b) Umidades diárias (média e mínima), (c) Chuva acumulada (mm) e (d) Radiação solar diária



(a)



(b)



(c)



(d)

Dados meteorológicos referentes ao mês de Abril/2019 até 05/05/2019: (a) Temperaturas diárias (máxima, média, mínima), (b) Umidades diárias (média e mínima), (c) Chuva acumulada (mm) e (d) Radiação solar diária