



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO EM ENGENHARIA
QUÍMICA



Produção de P(3HB) por *Priestia megaterium* a partir de resíduos industriais

Autora: Bianca Vitória Scottá

Orientadores: Débora Jung Luvizetto Faccin

e Nilo Sérgio Medeiros Cardozo

Porto Alegre, setembro de 2022

Autora: Bianca Vitória Scottá

Produção de P(3HB) por *Priestia megaterium* a partir
de resíduos industriais

*Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
COMGRAD/ENQ da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Bacharel em Engenharia
Química*

Orientadora: Débora Jung Luvizetto Faccin
Coorientador: Nilo Sérgio Medeiros Cardozo

Banca Examinadora:

Doutora, Caroline Borges Agustini, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Doutora, Daniele Misturini Rossi, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre

2022

Agradecimentos

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, aos seus professores, funcionários e ao Departamento de Engenharia Química.

Aos meus orientadores, Débora Jung Luvizetto Faccin e Nilo Sérgio Medeiros Cardozo, por todos os ensinamentos e suporte, que me possibilitaram a realização dessa pesquisa da melhor forma possível.

À minha família e amigos, que sempre me deram apoio e incentivo, em todos os momentos ao longo dessa jornada.

Aos técnicos do DEQUI e doutorandos, especialmente Eduardo e a Xilena, e minha colega e amiga Tailíni por todo o auxílio fornecido para realização dessa pesquisa.

Ao meu amor, Bruno, por todo apoio e compreensão em momentos difíceis e de ausência para foco nos estudos e por todo o incentivo dado.

Aos meus pais, Gilberto e Viviane, e avós que me propiciaram todo o suporte para que eu pudesse prosseguir com os estudos, além de amor, companheirismo e incentivo.

RESUMO

O poli(3-hidroxi-butirato) é um biopolímero biodegradável com amplo potencial de aplicações. É sintetizado por microrganismos que utilizam diversas fontes de carbono e possui propriedades muito semelhantes ao polipropileno, um polímero petroquímico, com a vantagem de causar menos impactos ambientais. Entretanto, possui uma grande desvantagem por apresentar alto custo de produção, causado principalmente pela fonte de carbono utilizada para síntese e pela necessidade de recuperação do interior da célula. Nesse sentido, foram avaliados diferentes resíduos industriais para produção do P(3HB) com o objetivo de minimizar o custo de produção desse polímero. O microrganismo utilizado foi a *Priestia megaterium* e foram realizados cultivos em batelada em estufa incubadora rotatória (30 °C, 180 rpm e de 20 h, 24 h, 28 h e 48 h), utilizando meio mineral contendo sacarose, permeado de leite com enzima lactase e sem enzima lactase, resíduo da indústria de chocolate Florybal e efluente da indústria Florestal como substratos. Foram quantificados, além do percentual de produção do P(3HB), valores de biomassa, de açúcares remanescente no meio após os cultivos e de pH. Os resultados indicaram que os cultivos realizados com meio mineral e efluente da indústria Florestal produziram as maiores quantidades de P(3HB), o percentual máximo de P(3HB) em cada resíduo foi de 42 % em 28 h no cultivo de meio mineral, 47 % em 20 h no cultivo do efluente proveniente da indústria Florestal, 19 % em 20 h para o permeado com enzima e 5 % nos cultivos com extrato da indústria de chocolates Florybal. Na produção com resíduos da indústria de chocolates Florybal e com permeado de leite foi verificado também um baixo consumo de açúcares durante o cultivo e pequena produção de biomassa indicando necessidade de suplementação do meio, em compensação, o efluente Florestal apresentou uma produção de P(3HB) ainda maior que as amostras obtidas com meio mineral contendo sacarose como fonte de carbono, mesmo contendo inicialmente quantidade menor de açúcares. Foi observado que todos os resíduos cultivados com *P. megaterium* produziram o polímero P(3HB), indicando forte potencial de utilização como substrato para a produção e redução de custos inerentes ao processo produtivo, sendo importante avaliação das melhores condições de cultivo e verificação da necessidade de suplementação no meio com micronutrientes.

Palavras-chave: poli(3-hidroxi-butirato), *Priestia megaterium*, resíduos, biopolímero

ABSTRACT

Poly(3-hydroxybutyrate) is a biodegradable biopolymer with wide application potential. It is synthesized by microorganisms that use various carbon sources and has properties very similar to polypropylene, a petrochemical polymer, with the advantage of causing less environmental impacts. However, it has a great disadvantage for presenting high production cost, mainly caused by the carbon source used for synthesis and the need for recovery of the cell interior. In this sense, different industrial residues for the production of P(3HB) were evaluated in order to minimize the cost of production of this polymer. The microorganism used was *Priestia megaterium* and batch cultures were performed in a rotary incubator oven (30 °C, 180 rpm and 20 h, 24 h, 28 h and 48 h), using mineral medium containing sucrose, permeated milk with lactase enzyme and without lactase enzyme, Florybal chocolate industry residue and forest industry effluent as substrates. In addition to the percentage of P(3HB) production, values of biomass, remaining sugars in the medium after cultivation and pH were quantified. The results indicated that the crops carried out with mineral medium and effluent of the Florestal industry produced the highest amounts of P (3HB), the maximum percentage of P (3HB) in each residue was 42 % in 28 h in the cultivation of mineral medium, 47 % in 20 h in the cultivation of the effluent from the Florestal industry, 19 % in 20 h for the permeated with enzyme and 5 % in the cultivation with extract from the Florybal chocolate industry. In the production with residues of the Florybal chocolate industry and with milk permeate was also found a low consumption of sugars during cultivation and small production of biomass indicating the need for supplementation of the medium, in compensation, the Florestal effluent presented a production of P (3HB) even higher than the samples obtained with mineral medium containing sucrose as carbon source, even initially containing less amount of sugars. It was observed that all residues grown with *P. Megaterium* produced the polymer P (3HB), indicating strong potential of use as substrate for production and reduction of costs inherent to the production process, evaluation of the best cultivation conditions and verification of the need for supplementation in the medium with micronutrients.

Keywords: *poly(3-hydroxybutyrate), Priestia megaterium, waste, biopolymer*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura geral dos PHAs e alguns representantes	3
Figura 2: Degradação em solo dos filmes de PHA em 21 °C (a) e 28 °C (b), sendo as composições a—P(3HB/4HB); b—P(3HB/3HV); c—P(3HB/3HHx), d—P(3HB)	6
Figura 3: Resíduo de chocolate com recheio doados pela indústria Florybal	14
Figura 4: Homogeneização do extrato de chocolate Florybal em água	15
Figura 5: Solução residual da indústria de doces Florestal	15
Figura 6: Meios após cultivo em 24 horas	17
Figura 7: Curva padrão da glicose.....	18
Figura 8: Curva padrão da lactose	18
Figura 9: Curva padrão da frutose	19
Figura 10: Curva padrão da galactose.....	19
Figura 11: Curva padrão para quantificação de P(3HB).....	21
Figura 12: Exemplo de cromatograma relativo à amostra padrão de P(3HB). Sendo o pico 1 referente ao dicloroetano, o pico 2 referente ao polímero P(3HB) e o pico 3 referente ao pico do padrão ácido benzoico	22
Figura 13: Extrato após centrifugação com película de gordura sobrenadante e precipitado de cacau.....	24
Figura 14: Resultado da precipitação de cacau após métodos de a) banho de gelo b) centrifugação.....	25
Figura 15: Biomassa observada nos diversos meios de cultivo, sendo a) permeado com enzima b) permeado sem enzima c) resíduo da indústria de doces Florestal d) sacarose e) resíduo da indústria de chocolate Florybal sem centrifugar o extrato f) resíduo da indústria de chocolate Florybal com extrato centrifugado.	26
Figura 16: Concentração obtida do biopolímero P(3HB) produzidos nas biomassas dos diferentes cultivos.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies de bactérias capazes de acumular PHAs.	4
Tabela 2: Diferentes PHAs e suas principais propriedades.....	7
Tabela 3: Comparativo das propriedades do biopolímero P(3HB) com o polímero polipropileno.....	8
Tabela 4: Empresas produtoras de P(3HB) ao redor do mundo.	8
Tabela 5: Comparativo da utilização da bactéria <i>B. megaterium</i> em diferentes experimentos em biorreator.....	10
Tabela 6: Composição do meio mineral.	13
Tabela 7: Composição da solução de micronutrientes.....	13
Tabela 8: Concentração de diferentes tipos de açúcares por substrato avaliado.	23
Tabela 9: Massa de precipitado obtida após centrifugação do substrato antes do cultivo....	23
Tabela 10: Métodos de remoção do cacau e massa final obtida de precipitado após centrifugação.	24
Tabela 11: Açúcares resultantes do sobrenadante após testes de remoção de cacau e ácidos graxos a partir de uma concentração inicial de $32,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de chocolate.	25
Tabela 12: Concentração ao longo do tempo dos diferentes tipos de açúcares após produção, sendo C_0 a concentração inicial do açúcar no substrato.	26
Tabela 13: Quantidade de biomassa obtida em peso seco ao longo do tempo. C_0 é a quantidade de açúcares inicial.	27
Tabela 14: Resultados de pH medidos ao longo do tempo.	27
Tabela 15: Percentual obtido do polímero P(3HB) em cada cultivo.	29

SUMÁRIO

1	Introdução	1
2	Revisão Bibliográfica	3
2.1	Polihidroxicanoatos	3
2.1.1	Microrganismos produtores	4
2.1.2	Biodegradabilidade	5
2.1.3	Propriedades	6
2.1.4	Poli-3-hidroxi-butirato (P(3HB))	7
2.2	Produção de PHA por <i>Bacillus megaterium</i>	9
2.3	Uso de resíduos industriais como fontes de carbono	10
3	Materiais e Métodos	12
3.1	Microrganismo e meios de cultivo	12
3.1.1	Microrganismo utilizado	12
3.1.2	Condições do Pré-inóculo	12
3.1.3	Meio mineral	12
3.1.4	Avaliação inicial do potencial de crescimento nos resíduos industriais	13
3.1.5	Resíduo da indústria de chocolate Florybal	14
3.1.6	Efluente da indústria de doces Florestal	15
3.1.7	Permeado de leite	16
3.1.8	Cultivo em diferentes meios	16
3.2	Análises	17
3.2.1	Determinação da biomassa	17
3.2.2	Quantificação de açúcares	17
3.2.3	Construção de curvas padrão	17
3.2.4	Quantificação de açúcares nos substratos	19
3.2.5	Quantificação de açúcares após produção	19
3.2.6	Teste de precipitação	19
3.2.7	Quantificação de P(3HB)	20
3.2.8	Análise estatística	22
4	Resultados e Discussão	23
4.1	Açúcares nos substratos	23
4.2	Testes de precipitação	23
4.2.1	Teste de precipitação no resíduo industrial da empresa Florybal	23
4.3	Açúcares após cultivos	25
4.4	Crescimento celular	26
4.5	Quantificação de P(3HB)	28
5	Conclusões e Trabalhos Futuros	31
6	Referências Bibliográficas	33
	ANEXO A	37
	APÊNDICES	39

1 Introdução

São inúmeras as aplicabilidades de materiais plásticos na rotina diária das pessoas. Esses polímeros podem ser utilizados na produção de embalagens, vestuário, equipamentos eletrônicos, automóveis e muitas outras aplicações. Devido a essas inúmeras funcionalidades dos materiais plásticos, seu consumo mundial é muito elevado. Segundo o relatório da The Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), o consumo de plástico pode triplicar até 2060, chegando à 1,2 bilhão de toneladas (OECD, 2022).

De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU), 91 % de todo o material produzido por plástico é utilizado apenas uma vez, considerando que a maioria dos plásticos são de origem fóssil, a situação é ainda mais agravada, uma vez que além desses materiais acumularem no meio ambiente, devido ao descarte incorreto e ao grande volume de utilização, afetam oceanos e todo o ecossistema. Além disso, seu processo de produção ocasiona um alto impacto ambiental, com relação ao efeito estufa. O relatório da OECD informa que até 2060 as emissões de gases de efeito estufa do ciclo de vida dos materiais plásticos irão passar de 1,8 gigatoneladas para 4,3 gigatoneladas de CO₂ (ONU, 2018; OECD, 2022).

Outro problema, além do alto consumo de plástico, é o baixo percentual de reciclagem desses materiais. Essa situação é observada também no Brasil, que, de acordo com o levantamento realizado pelo World Wildlife Fund (WWF), é o quarto maior produtor de plástico mundialmente. O País produz em torno de 11,3 milhões de toneladas, sendo que apenas 145 mil toneladas, ou seja, 1,28 % desses polímeros são reciclados (WORLD WILDLIFE FUND, 2019).

Um importante ponto relacionado aos plásticos petroquímicos é o fato de não serem prontamente biodegradáveis em condições ambientais e se acumularem no meio ambiente por anos, além de serem formados a partir de matéria-prima não renovável, o petróleo. Com o objetivo de redução desse grande impacto ambiental, vem crescendo o interesse no desenvolvimento de polímeros biodegradáveis produzidos a partir de fontes renováveis, com propriedades similares às dos polímeros derivados do petróleo, com possibilidade de substituição, em partes, destes.

Os plásticos biodegradáveis podem ser decompostos por microrganismos encontrados na natureza, além disso, as maiores fontes de matéria-prima para produção desses polímeros são de origem renováveis, como, por exemplo, o amido, lignina, celulose, sacarose, dentre outras fontes. Dentre os exemplos de polímeros biodegradáveis estão os sintéticos, como o poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA) e poli(ácido glicólico-ácido lático) (PGLA) e os polímeros biodegradáveis naturais, sintetizados por meio de crescimento de organismos vivos, como por exemplo, os polihidroxialcanoatos (PHAs) (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006).

Os PHAs são poliésteres biodegradáveis e biocompatíveis, e o mais comum é o Poli(3-hidroxi-butirato), P(3HB). Esses biopolímeros têm chamado a atenção de muitos pesquisadores, por terem uma variedade de aplicações e poderem substituir os plásticos petroquímicos, a fim de minimizar impactos causados no meio ambiente.

A atual principal desvantagem em relação aos PHAs é o custo de produção, sendo que a fonte de carbono utilizada tende ser o principal fator que inviabiliza a produção em larga escala, além do custo de recuperação. Assim, a procura por fontes de carbono menos custosas é de extrema importância para possibilitar o crescimento da produção e utilização dos PHAs. Inserido neste contexto, o presente trabalho objetiva avaliar diferentes resíduos industriais como substratos para produção de PHA, especificadamente, o P(3HB), utilizando a *P. megaterium* como microrganismo produtor. Serão quantificados a quantidade de polímero produzida a partir de cada meio, assim como crescimento de microrganismo, açúcares residuais no meio e valores de pH para verificar o potencial da utilização de tais resíduos.

2 Revisão Bibliográfica

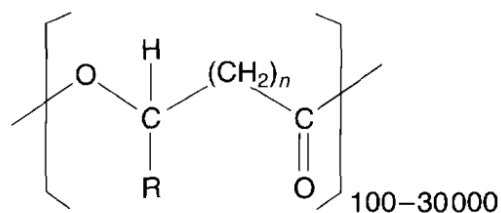
2.1 Polihidroxicanoatos

Com o propósito de armazenamento de carbono e energia intracelular, alguns microrganismos sintetizam um grupo de poliésteres naturais biodegradáveis, denominados polihidroxicanoatos (PHAs). Diversos microrganismos possuem a capacidade de produção dos PHAs e, na maior parte das vezes, a limitação de algum nutriente, como o nitrogênio, e uma grande quantidade de fonte de carbono propicia a produção desses polímeros, como fonte de reserva energética. Os PHAs são o maior grupo de poliésteres naturais, uma vez que já foram identificados 150 monômeros de PHA diferentes (SILVA et al., 2016; LI; YANG; LOH, 2016).

Dentre suas propriedades físico-químicas, destaca-se que os PHAs são biodegradáveis e insolúveis em água, biocompatíveis e não tóxicos. Além disso, os PHAs possuem propriedades similares às do polipropileno e polietileno, e devido a essas características, são considerados bons substitutos para estes polímeros derivados do petróleo. (DUTT TRIPATHI et al., 2021; ADELEYE et al., 2020)

Os PHAs, cuja fórmula estrutural está ilustrada na Figura 1, podem ser classificados por meio do comprimento (n) da cadeia carbônica do monômero. Os PHAs de cadeia curta (PHAscl) possuem de 3 a 5 átomos de carbono, os de cadeia média (PHAmcl), possuem 6 a 14 átomos de carbono e os de comprimento de cadeia longa (PHAlcl), possuem ao menos 14 átomos de carbono. Comparativamente, os PHAscl são mais quebradiços por possuírem maior grau de cristalinidade, enquanto os PHAmcl são polímeros elásticos e emborrachados (DUTT TRIPATHI et al., 2021).

Figura 1: Estrutura geral dos PHAs e alguns representantes



$n = 1$	R = hydrogen	Poly(3-hydroxypropionate)
	R = methyl	Poly(3-hydroxybutyrate)
	R = ethyl	Poly(3-hydroxyvalerate)
	R = propyl	Poly(3-hydroxyhexanoate)
	R = pentyl	Poly(3-hydroxyoctanoate)
	R = nonyl	Poly(3-hydroxydodecanoate)
$n = 2$	R = hydrogen	Poly(4-hydroxybutyrate)
	R = methyl	Poly(4-hydroxyvalerate)
$n = 3$	R = hydrogen	Poly(5-hydroxyvalerate)
	R = methyl	Poly(5-hydroxyhexanoate)
$n = 4$	R = hexyl	Poly(6-hydroxydodecanoate)

Fonte: LEE, 1996b.

2.1.1 Microrganismos produtores

A partir de diversas fontes de carbono, inúmeras espécies de microrganismos são capazes de produzir PHAs. Segundo Anjum et al. (2016), existem mais de 300 espécies de microrganismos que possuem a capacidade de produzir PHAs, e neste grupo, as bactérias estão em maioria, incluindo tanto bactérias Gram-positivas, como Gram-negativas.

Esses microrganismos produzem PHAs como uma forma de armazenamento de energia e fonte de carbono em seus citoplasmas. A necessidade de certas condições para que sejam produzidos esses biopolímeros é um fator classificatório desses microrganismos, que os divide principalmente em dois grupos. O primeiro grupo é composto por bactérias sintetizadoras de PHAs que necessitam de condições limitantes de nutrientes essenciais tais como nitrogênio, fósforo ou magnésio, além de quantidade excessiva de carbono. No segundo grupo, não são necessárias condições limitantes e os PHAs são acumulados na fase de crescimento dessas espécies. Exemplos de espécies do primeiro e segundo grupo são a *Cupriavidus necator* e *Escherichia coli recombinante*, respectivamente (KHATAMI et al., 2021). Na Tabela 1 estão ilustradas algumas espécies de bactérias que acumulam PHAs.

Tabela 1: Espécies de bactérias capazes de acumular PHAs.

Nome da bactéria	PHA produzido
<i>Cupriavidus necator</i>	PHB
<i>Escherichia coli</i> recombinante	PHB, PHBV,
<i>Pseudomonas</i>	P(3HA), P(3HB),
Cepas mutantes de <i>Cupriavidus necator</i>	P(3HB-4HB),
<i>Azohydromonas lata</i>	P3HHx, P3HO
<i>Azotobacter vinelandii</i>	
<i>Chromatium vinosum</i>	PHB, P(3HA)
<i>Thiocystis violacea</i>	PHB, PHBV
<i>Bacillus cereus</i>	
<i>Sphingopyxis terrae</i>	PHB, PHV,
<i>Aeromonas ichthiosmia</i>	P3HHx, P3HO
<i>Bacillus pumilus</i>	
<i>Pseudomonas putida</i>	
<i>Bacillus megaterium</i>	PHB

Fonte: Adaptado de TARRAHI et al., 2020

Atualmente, bactérias Gram-negativas são as principais sintetizadoras dos PHAs em produção comercial. No entanto, possuem uma grande desvantagem por produzirem PHAs que podem conter endotoxinas, dependendo do método de extração, o que acarreta uma limitação em sua utilização, como, por exemplo, em aplicações biomédicas (MOHAPATRA et al., 2020). Em relação a isso, a produção de PHAs por bactérias Gram-positivas do gênero *Bacillus* é muito vantajosa, uma vez que essas bactérias são capazes de produzir PHAs livres de endotoxinas, além de alcançar melhores rendimentos poliméricos e possibilitarem um tempo menor de produção. Adicionalmente, bactérias do gênero *Bacillus* podem sintetizar PHAs a partir de uma diversa gama de substratos, inclusive resíduos, tornando mais viável o custo de produção desses polímeros (THIRUMALA; REDDY; MAHMOOD, 2010).

Cabe mencionar que recentemente diversas bactérias do gênero *Bacillus*, tais como *Bacillus abyssalis*, *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus endophyticus*, entre outras foram reclassificadas como pertencentes ao gênero *Priestia*. Sendo assim, a bactéria *Bacillus megaterium* atualmente é classificada como *Priestia megaterium* (GUPTA *et al.*, 2020). No presente trabalho, na revisão bibliográfica optou-se por seguir com nomenclatura original que foi empregada em cada artigo. Sendo assim, se o artigo foi publicado com o nome *B. megaterium*, manteremos este nome.

2.1.2 Biodegradabilidade

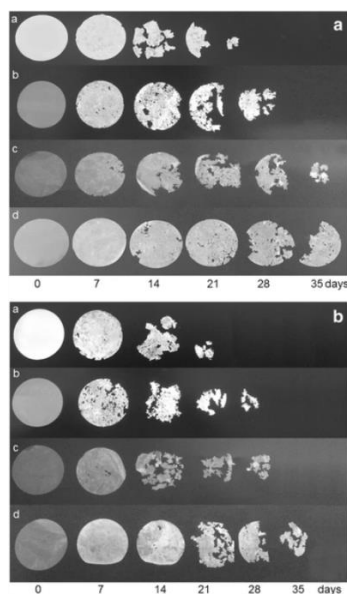
Os PHAs são polímeros totalmente biossintéticos e biodegradáveis, sua degradação gera produtos não tóxicos para o meio ambiente. A degradação dos PHAs pelos microrganismos resulta em água e dióxido de carbono, caso as condições ambientais sejam aeróbias, e em água e metano e dióxido de carbono caso as condições ambientais sejam anaeróbias. Para ocorrer o processo de degradação nos PHAs, microrganismos que estão presentes no solo possuem a capacidade de hidrolisar as ligações éster desses polímeros, por meio da secreção de enzimas PHA depolimerases, em monômeros e oligômeros hidrossolúveis (CHANPRATEEP, 2010; VOLOVA *et al.*, 2017).

Volova *et al.* (2017) realizaram um estudo abordando a degradação de diferentes PHAs - o polímero P(3HB) e copolímeros de P(3HB) com 3-hidroxivalerato P(3HB/3HV), 4-hidroxi butirato P(3HB/4HB), e 3-hidroxi hexanoato P(3HB/3HHx) (10–12 % em mol) — em solo de campo agrotransformado da zona temperada. O objetivo foi comparar a degradação dos PHAs mencionados em diferentes composições químicas, além de isolar e identificar microrganismos degradadores desses PHAs.

Os filmes foram pesados, após dispostos em sacos de malha de nylon e enterrados no solo do campo, a profundidade foi de 2 cm. O tempo de incubação foi de 35 dias, em teor de umidade do solo em 50 % e temperatura de 21 °C e 28 °C. A cada intervalo de 7 dias, um saco com cada tipo de polímero era retirado do solo para que fosse determinada a perda de massa. Após a retirada do solo, as amostras eram enxaguadas em água destilada, secas em termostato de 40 °C em um tempo de 24 horas, até o peso constante, após pesadas em balança analítica. A perda de massa das amostras, mudança de massa molar, grau de cristalinidade, morfologia e propriedades das superfícies foram parâmetros indicativos da biodegradação do PHA (VOLOVA *et al.*, 2017).

No estudo de Volova *et al.* (2017), os PHAs foram classificados a partir de suas taxas de degradação, na temperatura de 28 °C a perda de massa dos filmes de PHA não foi significativa nos primeiros 7 dias. Após 21 dias, os filmes de P(3HB/4HB) tiveram 97 % de sua composição degradada, entretanto os filmes de P(3HB) tiveram apenas 60 % de sua composição degradada. Aos 35 dias, a degradação das amostras de P(3HB) atingiram o valor de 93 %. Os filmes de P(3HB/3HHx) e P(3HB/3HV) apresentaram taxas de degradação semelhantes e que foram intermediárias entre as observadas para as amostras de P(3HB/4HB) (maior taxa) e P(3HB) (menor taxa), conforme ilustra a Figura 2(b). Já em relação ao solo na temperatura de 21 °C, as taxas de degradação de todos os filmes de PHA diminuíram, conforme ilustra a Figura 2 (a).

Figura 2: Degradação em solo dos filmes de PHA em 21 °C (a) e 28 °C (b), sendo as composições a—P(3HB/4HB); b—P(3HB/3HV); c—P(3HB/3HHx), d—P(3HB)



Fonte: VOLOVA et al., 2017.

2.1.3 Propriedades

Além das características de biodegradabilidade e biocompatibilidade, os PHAs possuem boas propriedades, apresentando resistência à tração e ponto de fusão similares às do polipropileno. As propriedades dos PHAs possibilitam sua utilização como biomateriais, embalagens e revestimentos (BEHERA et al., 2022).

Os valores específicos das propriedades dos diferentes PHAs dependem fortemente de dos parâmetros estruturais apresentados na Figura 1. Assim, por exemplo, a sua temperatura de transição vítrea é inversamente proporcional ao comprimento da cadeia lateral, enquanto a temperatura de fusão é diretamente proporcional ao número de carbonos na cadeia lateral (BEHERA et al., 2022). A cristalinidade dos PHAs também difere de acordo com o comprimento da cadeia do polímero, em geral, os PHAs_{cl} apresentam valores entre 60 e 80 % de cristalinidade. Os PHAs_{ml} apresentam um grau de cristalinidade menor em relação aos PHAs_{cl}. Na Tabela 3 estão listadas algumas das propriedades de alguns PHAs. Desta forma, uma maior flexibilidade e elasticidade é apresentada nos PHAs_{ml} em relação aos PHAs_{cl}, os quais, por sua vez, possuem a característica de serem muito cristalinos e quebradiços (BEHERA et al., 2022).

Em relação às propriedades mecânicas dos PHAs, ocorre uma variação proporcional ao tamanho da cadeia do polímero. Geralmente, uma maior flexibilidade e elasticidade é apresentada nos PHAs_{ml} em relação aos PHAs_{cl}. Os PHAs_{cl} possuem a característica de serem muito cristalinos e quebradiços (BEHERA et al., 2022). Porém, em alguns casos, PHAs com mesmo número de carbonos em suas cadeias podem apresentar propriedades mecânicas bem diferentes devido à posição do grupo R na cadeia, que pode alterar a estrutura tridimensional do polímero, modificando suas propriedades mecânicas e sua cristalinidade. Estas

características tornam os PHAmcl mais apropriados para aplicações médicas (SANHUEZA et al., 2019).

Portanto, a partir da modificação estrutural, pode-se obter PHAs com propriedades bem variadas dos PHAs, tanto do ponto de vista de propriedades mecânicas como de propriedades físico-químicas, como resistência à umidade e barreira. A Tabela 2 apresenta valores de propriedades mecânicas para alguns PHAs.

Tabela 2: Diferentes PHAs e suas principais propriedades

Polímero	Temperatura de Fusão (°C)	Módulo de Young (GPa)	Tensão de ruptura (MPa)	Elongação até a ruptura (%)	Resistência ao impacto izod (J/m)
P(3HB) ¹	179	3,5	40	5	50
P(3HB-co-3HV) ²					60
3 mol% 3HV	170	2,9	38	-	95
9 mol% 3HV	162	1,9	37	-	120
14 mol% 3HV	150	1,5	35	-	200
20 mol% 3HV	145	1,2	32	-	400
25 mol% 3HV	137	0,7	30	-	
P(3HB-co-3HB) ³					
3 mol% 4HB	166	-	28	45	-
10 mol% 4HB	159	-	24	242	-
16 mol% 4HB	-	-	26	444	-
64 mol% 4HB	50	30	17	591	-
90 mol% 4HB	50	100	65	1080	-
P(4HB) ⁴	53	149	104	1000	-
P(3HHx-co-3HO) ⁵	61	-	10	300	-
Polipropileno	170	1,7	34,5	400	45
Tereftalato de polietileno	262	2,2	56	7300	3400
Poliestireno	110	3,1	50	-	21

Fonte: LEE, 1996a

Todas essas propriedades possibilitam a aplicação dos PHAs em diversas funcionalidades. Propriedades como biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade, por exemplo, são essenciais para aplicações na área médica como administração de medicamentos, engenharia de tecidos e curativos. Adicionalmente, o PHA pode ser aplicado no ramo agrícola, uma vez que é capaz de melhorar propriedades nutricionais das plantas em ambientes sob condições de estresse. Outras aplicações agrícolas envolvem a proteção dos cultivos com a utilização desses filmes plásticos biodegradáveis, além de encapsulamento de sementes e fertilizantes (SHARMA; SEHGAL; GUPTA, 2021).

2.1.4 Poli-3-hidroxibutirato (P(3HB))

Uma pequena quantidade de PHAs são caracterizados e produzidos em grandes quantidades, dentre esses, está incluído o P(3HB), o PHA melhor caracterizado e mais utilizado. O P(3HB) é um PHAscl que possui acima de 50 % de cristalinidade, característica que se deve ao fato das suas cadeias poliméricas estarem em uma configuração isostática (CZERNIECKA-KUBICKA *et al.*, 2017; SANHUEZA et al., 2019). Possui alta versatilidade, podendo ser extrusado, transformado em filmes, moldado ou fiado em fibras. Além disso, o

P(3HB) possui propriedades semelhantes aos plásticos convencionais, como, por exemplo, o polietileno e polipropileno. Adicionalmente, com o objetivo de produção de heteropolímeros, é possível realizar misturas de P(3HB) com outros polímeros para essa finalidade (SANHUEZA et al., 2019).

Na Tabela 3 estão apresentadas algumas das propriedades do P(3HB) comparativamente com as propriedades do polipropileno.

Tabela 3: Comparativo das propriedades do biopolímero P(3HB) com o polímero polipropileno

Parâmetros	Plástico convencional	Biopolímero
	PP	P(3HB)
Temperatura de fusão (°C)	170	168-182
Cristalinidade (%)	50-70	60
Temperatura de transição vítrea (°C)	-10	2-4
Elongação de ruptura (%)	400	5
Força de tensão (Mpa)	38	43

Fonte: Adaptada de BELLINI et al., 2022

O P(3HB) é produzido mundialmente por várias empresas, porém, comparativamente aos plásticos petroquímicos, esse biopolímero possui uma desvantagem de possuir um alto custo de produção, devido à sua fonte de carbono e pelo fator de ser intracelular, o que ocasiona um alto custo também na etapa de recuperação. Entretanto, suas propriedades de biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade atraem atenção para a sua produção. Alguns exemplos de empresas produtoras de P(3HB) estão ilustradas na Tabela 4.

Tabela 4: Empresas produtoras de P(3HB) ao redor do mundo.

Empresa	Tipo de PHA	Produção (ton/ano)
Medpha, China	P3HB4HB	100
COFCO, China	PHB	1000
TianAn Biopolymer, China	PHBV	2000
GreenBio, Tianjin, China	P3HB4HB	10000
Danimer Scientific, EUA	PHBHHx	10000
Metabolix, EUA	P3HB4HB	5000
Kaneka, Japão	PHBHHx	5000
Biocycle, Brasil	PHB	100

Fonte: Adaptada de TAN et al., 2021

2.2 Produção de PHA por *Bacillus megaterium*

Dentre os microrganismos produtores de P(3HB) estão as cepas do gênero *Bacillus*.

A bactéria *Bacillus megaterium* tem a capacidade de viver em diversos habitats, tais como solo, água do mar, sedimentos, peixes e outros. Além disso, é uma bactéria Gram-positiva e possui as características de ser aeróbia e formadora de esporos. Possui a capacidade de produção de P(3HB) nos primeiros estágios da esporulação, esse polímero terá a função de ser a fonte de carbono para a biossíntese do esporo. (VARY et al., 2007; CAL et al., 2021).

Mundialmente, a obtenção de P(3HB) primeiramente foi a partir da bactéria *B. megaterium*, no entanto, sua produção em escala industrial foi majoritariamente a partir de proteobactérias gram-negativas. Uma grande vantagem da produção de P(3HB) por *B. megaterium* é sua capacidade de produção por diversas fontes de carbono de menor custo, tais como lactose, sacarose e outros. (CAL et al., 2021; FACCIN, 2007).

Mohanrasu et al. (2020) estudaram a produção de P(3HB) a partir de diversos substratos, utilizando uma cepa da *B. megaterium* obtida de amostras marinhas e sedimentos de água identificada por *B. megaterium* MK386891. O grupo utilizou diversas fontes de carbono para produzir P(3HB), dentre elas glicose, arabinose, glicerol, ácido láctico, lactose, manitol, acetato de sódio, amido e sacarose a 20 g·L⁻¹. Foi observado que a *B. megaterium* acumulou a quantidade máxima de P(3HB) (2,74 g·L⁻¹) utilizando glicose como substrato, após glicerol, lactose, acetato de sódio, manitol, sacarose, ácido láctico, arabinose e amido com 2,07 g·L⁻¹.

No estudo de Mohanrasu et al. (2020), também foi avaliado o efeito do pH na produção de P(3HB) e verificou-se que a *B. megaterium* foi capaz de produzir o polímero na faixa de pH de 6-9, com produção máxima (2,96 g·L⁻¹) no pH 7. Adicionalmente, nas faixas de pH <6 e >9 foi verificada produção de polímero em menor quantidade.

López et al. (2012) avaliaram a capacidade da cepa de *B. megaterium* BBST4 em relação ao acúmulo de P(3HB) em condições de cultivo limitadas. As fontes de carbono utilizadas foram glicose e glicerol. Os resultados apresentados pelo grupo utilizando essas duas fontes estão apresentados na Tabela 5. Foi observado que a fermentação da amostra GLY-1 de glicerol necessitou do maior tempo de fermentação entre todas as amostras. Como GLU-1 e GLY-1 foram estudados nas mesmas condições, o grupo concluiu que a *B. megaterium* possui capacidade de metabolizar mais rapidamente a glicose. Nas amostras GLU-2 e GLY-2 a razão carbono para nitrogênio foi maior do que nas outras amostras, indicando que uma maior razão carbono para nitrogênio resulta em menor acúmulo de P(3HB). Isso foi atribuído ao fato que essa condição induziu a formação de esporos e, conseqüente, baixa produtividade de P(3HB).

O trabalho teve como conclusão que a *B. megaterium* pode levar à uma alta produção de P(3HB) se aplicadas condições adequadas de fermentação e pode utilizar o glicerol como seu substrato, sendo essa uma estratégia de redução de custo de produção do polímero P(3HB) e ao mesmo tempo de valorização do glicerol, um subproduto da produção de biodiesel.

Tabela 5: Comparativo da utilização da bactéria *B. megaterium* em diferentes experimentos em biorreator

Fermentação	Fonte de carbono	Cultura	ICa (g/L)	Tempo (h)	DCW (g/L)	PHB (g/L)	PHB (%)	RB (g/L)	Produtividade (g/L/h)	
									PHB	RDW
GLU-1	Glicose	lote	20	34	5,1	3,0	59	2,1	0,088	0,062
GLU-2	Glicose	lote alimentado	25	32	11,3	3,3	29	8,0	0,103	0,251
GLY-1	Glicerol	lote	20	42	5,7	3,4	60	2,3	0,081	0,055
GLY-2	Glicerol	lote	50	32	7,8	2,4	31	5,4	0,075	0,168

Fonte: LÓPEZ *et al.*, 2012

2.3 Uso de resíduos industriais como fontes de carbono

Uma alternativa para reduzir o custo total de produção do P(3HB) é a utilização de resíduos industriais como fonte de substrato para a bactéria. A exemplo disso, os resíduos da indústria de laticínios vêm sendo muito estudados como uma alternativa. RamKumar Pandian *et al.* (2010) avaliaram o uso de soro gerado a partir da prensagem do queijo como fonte de carbono na produção do P(3HB), mostrando que a bactéria *B. megaterium* SRKP-3 sintetiza de forma muito eficiente esses resíduos. Neste caso, o uso do soro de leite para produção de P(3HB) traria dois benefícios importantes: (i) dar um destino mais nobre a esse resíduo, que é considerado poluente, devido à sua alta demanda biológica de oxigênio, e possui um custo alto de descarte; (ii) diminuição de custos de produção do PHB.

RamKumar Pandian *et al.* (2010) realizaram um estudo com a combinação de resíduos lácteos, farelo de arroz e água do mar com a função de substratos para a produção de P(3HB) por *B. megaterium*. O uso de água do mar como substrato baseou-se no fato que o cloreto de sódio, presente na água marinha, é considerado um importante nutriente para a produção de P(3HB), sendo uma fonte de minerais para a bactéria. O farelo de arroz funcionou como a fonte de nitrogênio para a bactéria *B. megaterium*. Nesse estudo, foi concluído que a combinação dos resíduos lácteos, farelo de arroz e água do mar possibilitou a obtenção de P(3HB) a partir da bactéria *B. megaterium* de $11,32 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, o que pode vir a contribuir como uma disposição para resíduos lácteos.

Page (1992) realizou um estudo envolvendo melão de beterraba como a principal fonte de carbono para a produção de PHA por *Azotobacter vinelandii* UWD e conseguiu, dessa forma, reduzir em 1/3 o custo de produção comparativamente à utilização da glicose para a produção do polímero.

Rami Reddy Tadi *et al.* (2021) investigaram a utilização do farelo de milho e farinha de colza como substrato para a produção de P(3HB) por *B. megaterium*. Foram verificadas diversas vantagens na utilização desses substratos. Primeiramente, o farelo de milho corresponde à cerca de 8-15 % dos resíduos gerados nas indústrias de processamento de milho e possuem uma quantidade relevante de nutrientes essenciais que podem auxiliar na produção do P(3HB). A farinha de colza apresenta um alto teor de proteína e carboidratos, o que a torna interessante para ser utilizada como substrato na produção do polímero.

Gowda e Shivakumar (2014) avaliaram o uso do amido como substrato para produção de P(3HB) a partir da cepa *Bacillus Thuringiensis* IAM 12077. O amido primeiramente passou pelo

processo de hidrólise para liberação dos açúcares a fim de facilitar sua metabolização pela bactéria. O amido foi obtido dos resíduos agroindustriais farelo de arroz, farelo de trigo, semente de jaca, casca de batata, casca de manga, casca de ragi, palha e casca de jowar, além de farelo de soja. Dentre esses resíduos tratados por hidrólise ácida, o pó de semente de jaca como o substrato que levou à produção máxima de P(3HB). A enzima inata hidrolisada da casca de manga também se mostrou um bom substrato para a produção do polímero.

Hassemer et al. (2021) utilizaram águas residuais de confeitaria e água de parboilização do arroz como substratos na produção de P(3HB) por *B. megaterium*. Os resultados foram bastante promissores e podem valorizar esses resíduos, além de reduzir o custo produtivo do P(3HB), uma vez que o custo da fonte de carbono na produção de P(3HB) pode representar de 70 a 80 % do custo total de produção (CHOI; LEE, 1997).

3 Materiais e Métodos

Os experimentos detalhados no seguinte trabalho foram realizados no Laboratório de Bioprocessos (LABIO), localizado no Anexo I do Campus Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A fim de verificar o potencial de utilização de resíduos para a produção de P(3HB) por *P. megaterium* (reclassificada, anteriormente *B. megaterium*), foram realizados cultivos em batelada com os resíduos cedidos pelas indústria de doces Florestal, indústria de chocolate Florybal e indústria de leite Santa Clara, com ensaios realizados em duplicata.

3.1 Microrganismo e meios de cultivo

3.1.1 Microrganismo utilizado

O microrganismo utilizado no presente trabalho para sintetizar o biopolímero P(3HB) nos cultivos com diferentes resíduos foi a bactéria *P. megaterium*, armazenada congelada em solução composta contendo 20 % de glicerol.

3.1.2 Condições do Pré-inóculo

Para reativação das bactérias preparou-se o pré-inóculo em capela de fluxo laminar previamente limpa e esterilizada com luz ultravioleta (UV) durante 15 min. O pré-inóculo foi obtido após adicionar a bactéria *P. megaterium*, da cultura estoque, em frasco erlenmeyer de 250 mL contendo 48 mL de solução de meio mineral (descrita na seção 3.1.3) e sacarose ($16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), com adição de 2 mL de solução de sulfato de amônio ($50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) (essas soluções foram misturadas após terem sido autoclavadas separadamente). Os frascos foram colocados em estufa incubadora rotatória durante 20 horas, com agitação e temperatura controlados nos valores de 180 rpm e $30 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. O pré-inóculo contendo sacarose em meio mineral, após 20 h de cultivo, foi utilizado para inocular todos os cultivos realizados, independente do meio de cultivo. Para minimizar diferença de crescimento entre pré-inóculos produzidos em dias diferentes, padronizou-se o inóculo por meio de diluição do pré-inóculo com meio mineral estéril conforme está descrito na Seção 3.1.8.

3.1.3 Meio mineral

A fonte de carbono utilizada como controle nesse estudo foi a sacarose na concentração de $16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ com adição de sulfato de amônio ($2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) como fonte de nitrogênio, mantendo a razão carbono nitrogênio descrita na literatura (FACCIN, 2012). À essa solução foram adicionadas soluções de meio mineral e de micronutrientes, a composição e concentração dessas soluções estão descritas nas Tabelas 6 e 7. Este meio sintético é considerado completo sendo adicionados diversos nutrientes e será utilizado de base para comparação de crescimento e produção de biopolímero. Ressalta-se que este é o meio no qual serão realizados todos os pré-inóculos utilizados nos cultivos contendo os diferentes meios.

Tabela 6: Composição do meio mineral.

Composto	Concentração
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,008 g·L ⁻¹
Na ₂ HPO ₄	3,6 g·L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g·L ⁻¹
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g·L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01 g·L ⁻¹
Ácido Cítrico	0,1 g·L ⁻¹
Solução de Micronutrientes	1 mL·L ⁻¹

Tabela 7: Composição da solução de micronutrientes

Composto	Concentração
H ₃ BO ₃	300 mg·L ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	200 mg·L ⁻¹
ZnSO ₄ .7H ₂ O	30 mg·L ⁻¹
MnCl ₂ .4H ₂ O	30 mg·L ⁻¹
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	30 mg·L ⁻¹
NiSO ₄ .7H ₂ O	30 mg·L ⁻¹
CuSO ₄ .5H ₂ O	10 mg·L ⁻¹

3.1.4 Avaliação inicial do potencial de crescimento nos resíduos industriais

Com o objetivo de verificar o crescimento de biomassa nos diferentes meios com resíduos, foi realizada uma primeira produção para os resíduos da indústria de chocolate Florybal, indústria de doces Florestal e o permeado de leite (descrição do resíduo e sua origem serão apresentados em seções posteriores). Assim, foi possível definir se havia necessidade de diluição do meio e se o microrganismo era capaz de crescer em tais meios. Esses resultados iniciais não serão apresentados neste trabalho.

Na primeira produção realizada no resíduo da indústria de doces Florestal, foram preparadas duas soluções do resíduo, sendo uma diluída 10 vezes em água e outra contendo o resíduo bruto. Como a solução inicial apresentava um pH ácido, foi realizado o ajuste de pH até 7 utilizando solução 0,4 M de NaOH.

Para a primeira produção utilizando o resíduo permeado de leite foi preparada uma solução do permeado de leite diluído 4 vezes em água. O pH da solução foi ajustado até 7 com uma solução de NaOH 0,4 M.

No primeiro cultivo do resíduo da indústria Florybal foi preparada uma solução com o resíduo de chocolate contendo 16 g de açúcares (calculado conforme % de açúcares determinado na massa de chocolate) em 500 mL de água quente, em seguida foi submetido à agitação magnética (Figura 5). Para cada meio de cultivo descrito acima, foram preparados 2 erlenmeyers contendo 48 mL. Procedeu-se a esterilização por 15 min na temperatura de

121 °C em autoclave. Imediatamente antes do inóculo (2 % do volume de trabalho) adicionou-se em ambiente estéril a solução de sulfato de amônio ($50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), previamente autoclavada, na quantidade calculada para cada meio a fim de respeitar a razão C:N empregada no cultivo controle (com meio mineral). Não foram adicionados outros nutrientes.

3.1.5 Resíduo da indústria de chocolate Florybal

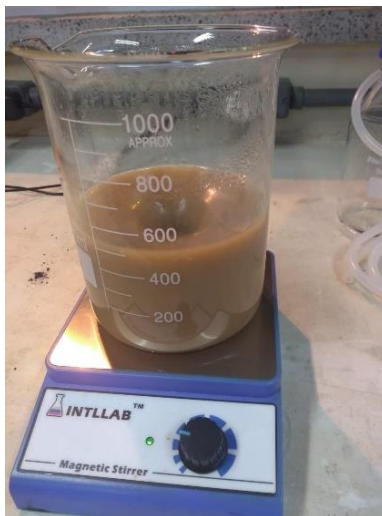
O resíduo utilizado foi doado pela indústria Florybal, localizada em Gramado, no Rio Grande do Sul. É um resíduo do processo de produção de chocolates, esse resíduo fica acumulado nos dosadores dos equipamentos. É uma mistura heterogênea de chocolate e recheio de frutas. Após o processamento, a indústria descarta esse resíduo por meio de envio para queima, e as cinzas restantes são utilizadas na indústria de cimento. O resíduo está ilustrado na Figura 3.

Figura 3: Resíduo de chocolate com recheio doados pela indústria Florybal



Para realizar a produção, foi preparada uma solução com o resíduo de chocolate Florybal contendo $16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de açúcares, (sabendo que aproximadamente 49 % da massa de chocolate é açúcar, conforme verificado na seção 4.1) em 1 L de água quente, em seguida, esta solução foi submetida à agitação magnética, como pode ser ilustrado na Figura 5. Após, ajustou-se o pH da solução até 7 com NaOH 0,4 M. O extrato foi separado em duas partes de 450 mL, sendo que uma das partes seguiu para etapa adicional de centrifugação, para remoção do excesso de cacau. A partir dos 450 mL que foram para a etapa de centrifugação, aproveitou-se o sobrenadante, o qual foi adicionado na quantidade de 48 mL em 8 erlenmeyers de 250 mL. O restante dos 450 mL, sem a centrifugação do extrato, foi adicionado na quantidade de 48 mL em 8 erlenmeyers de 250 mL. Para ambas as situações, dos 8 erlenmeyers, 2 foram cultivados por 20 h, 2 para 24 h, 2 para 28 h e 2 para 48 h. Procedeu-se a esterilização por 15 min na temperatura de 121 °C em autoclave, para garantir a esterilização dos meios. Imediatamente antes do inóculo adicionou-se em ambiente estéril a solução de sulfato de amônio (2 mL), previamente autoclavada, a fim de respeitar a razão C:N empregada no cultivo controle (com meio mineral). Cabe ressaltar que não foram adicionados outros nutrientes, além da fonte de nitrogênio.

Figura 4: Homogeneização do extrato de chocolate Florybal em água

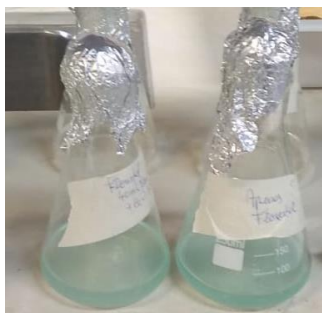


O cultivo objetivou verificar o crescimento celular após a realização do método de centrifugação para remoção do excesso de gordura e cacau do extrato, em comparação a não realizar essa etapa adicional. Para este meio realizou-se cultivo por tempo maior (2 frascos adicionais para tempo de 48 h), pois a amostra possui bastantes ácidos graxos (não determinados neste trabalho) que poderiam servir como substrato para a bactéria *P. megaterium*.

3.1.6 Efluente da indústria de doces Florestal

O efluente da indústria de doces foi doado pela empresa Florestal Alimentos, localizada no município de Lajeado, no Rio Grande do Sul. O efluente é proveniente da limpeza dos setores e lavagens de maquinários e possui uma DQO média de 12.000 à 18.000 mg·L⁻¹, segundo informado pela empresa. A relação das principais substâncias e matérias-primas passíveis de estarem presentes no efluente são: açúcar, xarope de glicose, goma base para chiclete, aromas, café solúvel em pó, leite condensado, gordura vegetal hidrogenada, ácido cítrico, manteiga de leite, manteiga de cacau, licor de cacau, sorbitol, soro de leite, corantes artificiais e naturais, lecitina de soja, polpas de fruta, amido de milho, talco grau alimentício, NaCl, isomalte, monitol, edulcorantes artificiais, glicerina, goma arábica, cera de carnaúba, proteína de leite, gelatina, amendoim, pasta de amendoim, bicarbonato de sódio, detergentes e hidróxido de sódio. O relatório de análises do efluente é apresentado no Anexo A.

Figura 5: Solução residual da indústria de doces Florestal



Em uma segunda batelada, após a batelada de avaliação inicial do potencial de crescimento em cada cultivo e após verificação dos resultados de HPLC, optou-se por preparar soluções concentradas do resíduo (Figura 5). O pH da solução foi ajustado para 7. Foram preparadas soluções em duplicatas para os tempos de 20 h, 24 h e 28 h de cultivo. Procedeu-se a esterilização por 15 min na temperatura de 121 °C em autoclave. Imediatamente antes de adicionar 1 mL do inóculo adicionou-se em ambiente estéril a solução de sulfato de amônio (1,2 mL), previamente autoclavada, a fim de respeitar a razão C:N empregada no cultivo controle (com meio mineral).

3.1.7 Permeado de leite

O permeado de leite foi doado pela Cooperativa Santa Clara Ltda., localizada em Carlos Barbosa, no Rio Grande do Sul. O permeado de leite é obtido a partir do processo de ultrafiltração do soro de leite com o objetivo de isolar as proteínas do soro de leite, que ficam retidas.

Em uma segunda batelada, foram preparadas amostras em duplicata de permeado de leite com enzima lactase e permeado de leite sem enzima lactase para os tempos 20 h, 24 h e 28 h. Para a solução de permeado de leite com enzima, foi acrescentado 600 µL de enzima lactase para 400 mL de permeado de leite, e agitou-se durante 4 horas em agitador magnético. Antes da inoculação, a quantidade de sulfato de amônio adicionada foi ajustada para seguir a proporção de 16 g de açúcares totais para 2 g de sulfato de amônio, resultando em 0,34 mL de sulfato de amônio adicionado para 48 mL da solução de permeado de leite. Antes da ativação do microrganismo, os erlenmeyers contendo as amostras foram postos em autoclave na temperatura de 121 °C durante 15 min para garantir a esterilização dos meios.

3.1.8 Cultivo em diferentes meios

Com finalidade de padronização do inóculo, os pré-inóculos contendo *P. megaterium* foram analisados em espectrofotômetro de absorção molecular na região do visível T80 (PG Instruments, no comprimento de onda em 600 nm) e diluídos até atingirem mesma absorbância e assim padronizar a quantidade de células, inoculada posteriormente em diferentes meios. O valor de absorbância padrão escolhido foi em 1,38, obtido por meio da diluição em 7 vezes com adição de meio mineral estéril.

Após, em capela de fluxo laminar, previamente limpa e esterilizada com UV durante 15 min, foram adicionados à cada uma das soluções de substrato, cujo preparo foi descrito nas seções 3.1.5, 3.1.6 e 3.1.7, 1 mL do pré-inóculo diluído 7 vezes representando 2% do volume de meio. Os erlenmeyers contendo os meios inoculados foram colocados em estufa incubadora rotatória, com agitação e temperatura controlados nos valores de 180 rpm e 30 °C, respectivamente. Os tempos de cultivo foram de 20 h, 24 h e 28 h para todos os meios e ainda para o meio contendo resíduo da Florybal teve-se cultivo também até 48 h. A Figura 6 ilustra as soluções de meio mineral e resíduo da indústria de chocolate Florybal após o cultivo de 24 h.

Figura 6: Meios após cultivo em 24 horas



3.2 Análises

3.2.1 Determinação da biomassa

A biomassa no meio cultivo foi quantificada através do método de gravimetria. Primeiramente, tubos falcons vazios foram colocados em estufa em temperatura de 80°C durante 24 horas, após pesou-se os tubos vazios em balança analítica.

Após o cultivo, foram recolhidas amostras de 20 mL no total do meio em duplicata para cada tempo de permanência na incubadora rotatória (18 h, 24 h e 28 h e para o cultivo da Florybal também de 48 h). Foi realizada centrifugação do material, duas vezes, recolhendo 10 mL de amostra em cada vez, durante 15 min e 4000 rpm. Os sobrenadantes após as centrifugações foram recolhidos e reservados para posteriores análises de pH e açúcares em HPLC. Na terceira centrifugação, os tubos falcons com a biomassa sedimentada foram lavados com 10 mL de água destilada. Após, os tubos contendo a biomassa foram colocados em estufa em temperatura de 80 °C até atingirem massa constante e pesados em balança analítica. Para o cálculo do valor da biomassa por gravimetria, foi feita a diferença entre o valor da massa do tubo falcon contendo a biomassa e o valor da massa do tubo falcon vazio. Após esta análise os tubos contendo a biomassa foram reservados para a quantificação de P(3HB).

3.2.2 Quantificação de açúcares

Com o objetivo de quantificar os níveis de sacarídeos nos substratos utilizados neste trabalho, foi realizada análise em HPLC (High Performance Liquid Chromatography), utilizando detector de índice de refração e coluna Rezex RHM – Monosaccharide H+ (8 %) – 300 x 7,8 mm, usando água como fase móvel com temperatura de 80 °C na coluna e 55 °C no detector.

3.2.3 Construção de curvas padrão

Primeiramente, foram preparadas soluções em água de glicose, sacarose, lactose, galactose e frutose nas concentrações de 0,5 g·L⁻¹, 1 g·L⁻¹, 2 g·L⁻¹, 3 g·L⁻¹ e 4 g·L⁻¹. As soluções foram filtradas em holders com uma membrana de material com poros de 22 µm, a fim de evitar contaminação no HPLC. Cabe mencionar que a sacarose nas condições de análise em HPLC sofre hidrólise e é quantificada como soma da glicose mais frutose.

A partir dos cromatogramas obtidos, construiu-se curvas padrões para cada um dos sacarídeos, com intersecção forçada no ponto (0,0). As curvas padrões obtidas estão ilustradas nas Figuras 7, 8, 9 e 10.

Figura 7: Curva padrão da glicose

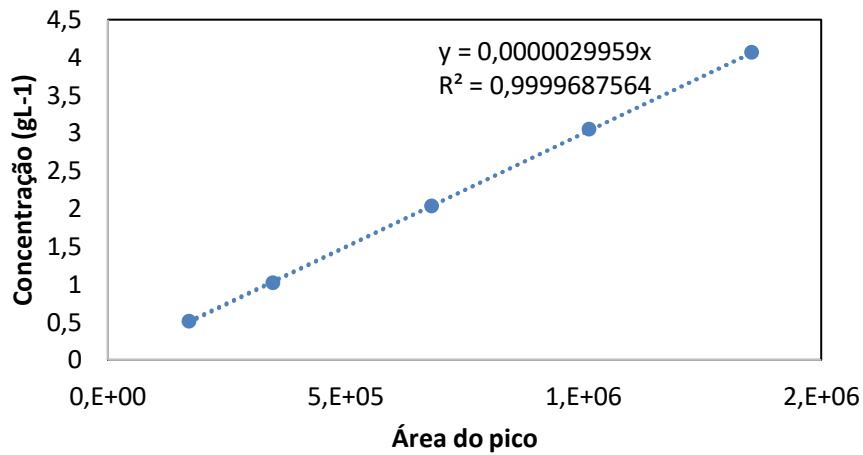


Figura 8: Curva padrão da lactose

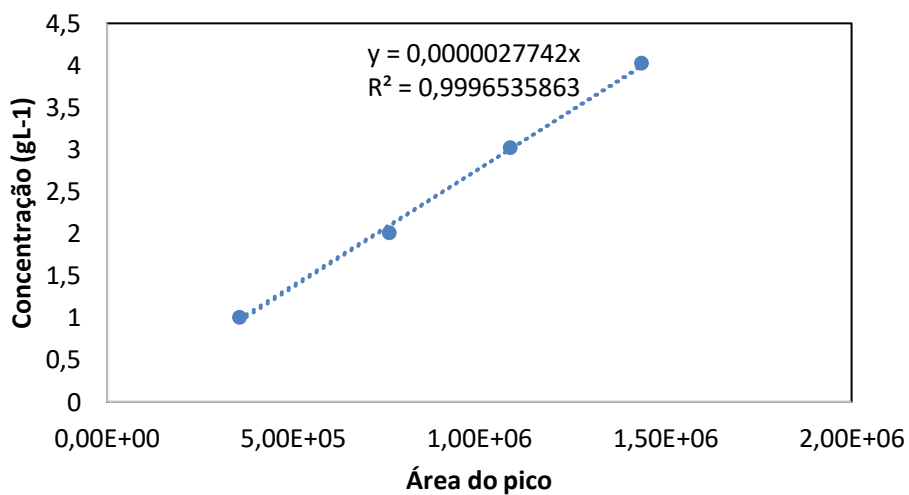


Figura 9: Curva padrão da frutose

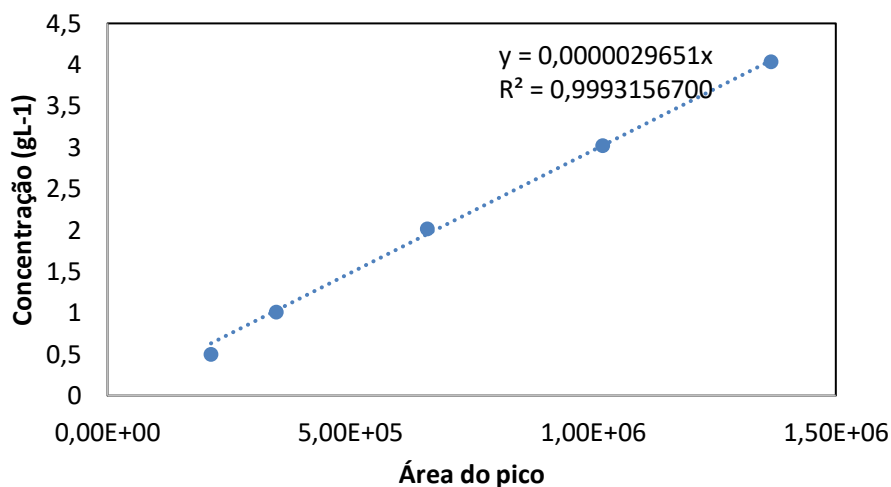
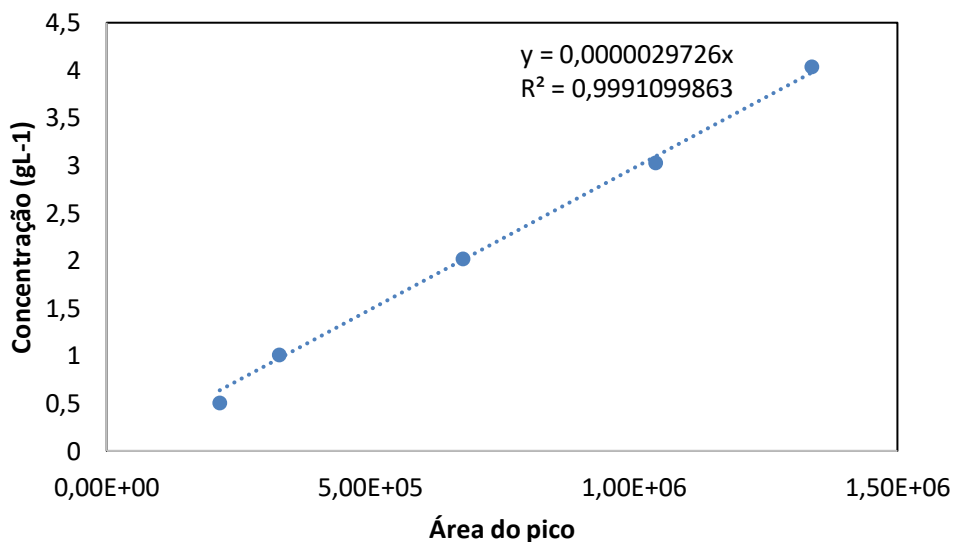


Figura 10: Curva padrão da galactose



3.2.4 Quantificação de açúcares nos substratos

Para quantificar os açúcares presentes nas amostras de permeado de soro de leite, resíduo da indústria de doces Florestal e resíduo da indústria de chocolates Florybal foram preparadas soluções diluídas, para garantir uma concentração entre $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e assim o ponto estar dentro da faixa de concentrações das curvas padrão.

3.2.5 Quantificação de açúcares após produção

A fim de quantificar os açúcares remanescente após período de amostragem do cultivo em batelada, realizou-se análises em HPLC do sobrenadante da metodologia de gravimetria utilizada para quantificação da biomassa.

3.2.6 Teste de precipitação

Com finalidade de reduzir o erro de quantificação da biomassa, realizou-se testes com os resíduos utilizados como meio de cultura. Para quantificar os sólidos particulados

eventualmente existentes no meio. Para tanto, foram realizadas centrifugações (15 min e 4000 rpm) de cada fonte de carbono. Foram adicionados em cada tubo falcon 20 mL de cada fonte de carbono. Metodologia empregada foi a mesma da quantificação de biomassa, mas realizada com o meio sem ser inoculado.

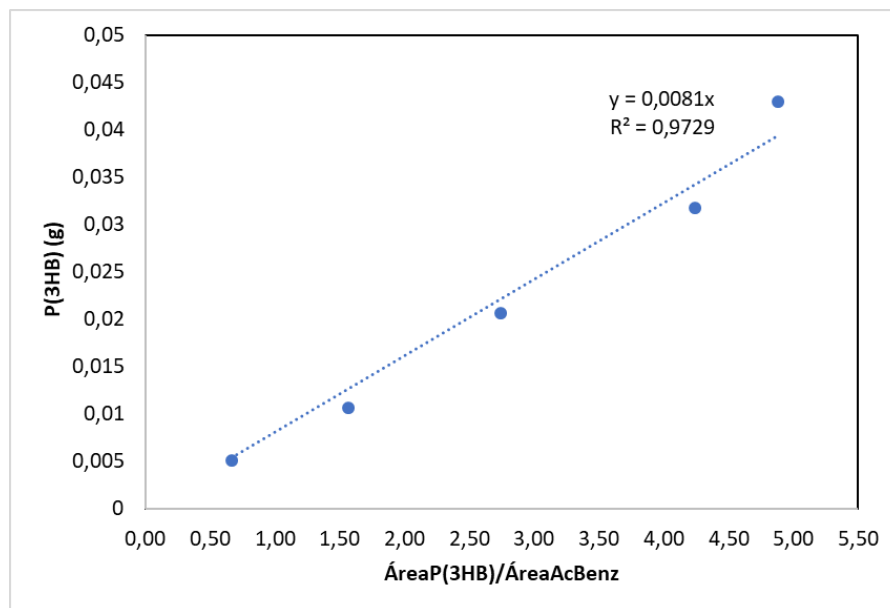
Para o resíduo da indústria de chocolates Florybal observou-se grande quantidade de precipitado, composto principalmente por cacau e ácidos graxos. Com o objetivo de minimizar a interferência dessa grande quantidade de precipitado, foram realizados dois testes de remoção desse precipitado. O primeiro foi em centrífuga refrigerada, o qual seguiu a mesma metodologia para os outros dois resíduos. O segundo teste foi realizado a partir da colocação da solução de chocolate e água em um banho de gelo. Aguardou-se a formação de uma nata na camada superior da solução, e precipitação do cacau. Após, foi recolhida a solução intermediária.

Ambas as soluções resultantes de cada teste, centrifugação e banho de gelo, foram centrifugadas para verificar a quantidade final obtida de precipitado seguindo método gravimétrico.

3.2.7 Quantificação de P(3HB)

Para verificação da produção do polímero P(3HB) foi realizado o método descrito por Riis e May (1988). Inicialmente a quantidade de 0,04 g de cada amostra de biomassa seca foi pesada em balança analítica e colocadas em frasco hermético, adicionalmente, foram pesadas as quantidades de 0,005 g, 0,010 g, 0,02 g, 0,03 g e 0,04 g do polímero puro comercial (SIGMA ALDRICH) para construção da curva padrão. Após, as amostras foram submetidas à propanólise, com o objetivo de quebrar o polímero e esterificar os componentes para sua quantificação em cromatografia gasosa. Para realizar a propanólise, foram adicionados em cada tubo contendo as amostras, 2 mL de n-propanol acidificado com ácido clorídrico (4:1 v/v), 2 mL de dicloroetano e 200 µL do padrão ácido benzoico (diluído em n-propanol). Os tubos foram hermeticamente fechados e colocados em banho maria na temperatura de 98 °C pelo tempo de 2,5 h e agitados a cada 20 min. Após esse processo, aguardou-se os tubos ficarem em temperatura ambiente e foram adicionados 4 mL de água destilada com posterior agitação. Foi coletada a fase orgânica para análise em cromatógrafo gasoso, marca Agilent. No cromatógrafo, com detector de ionização de chama, utilizando coluna Elite-WAX, foram injetados 2 µL de cada amostra e foi utilizado N₂ como gás de arraste, na vazão de 2 mL/min. A curva padrão obtida para correlação da massa de P(3HB) com a razão das áreas do pico de P(3HB) e padrão de ácido benzoico está ilustrada na Figura 11. Adicionalmente, o pico característico do P(3HB) pode ser verificado na Figura 12.

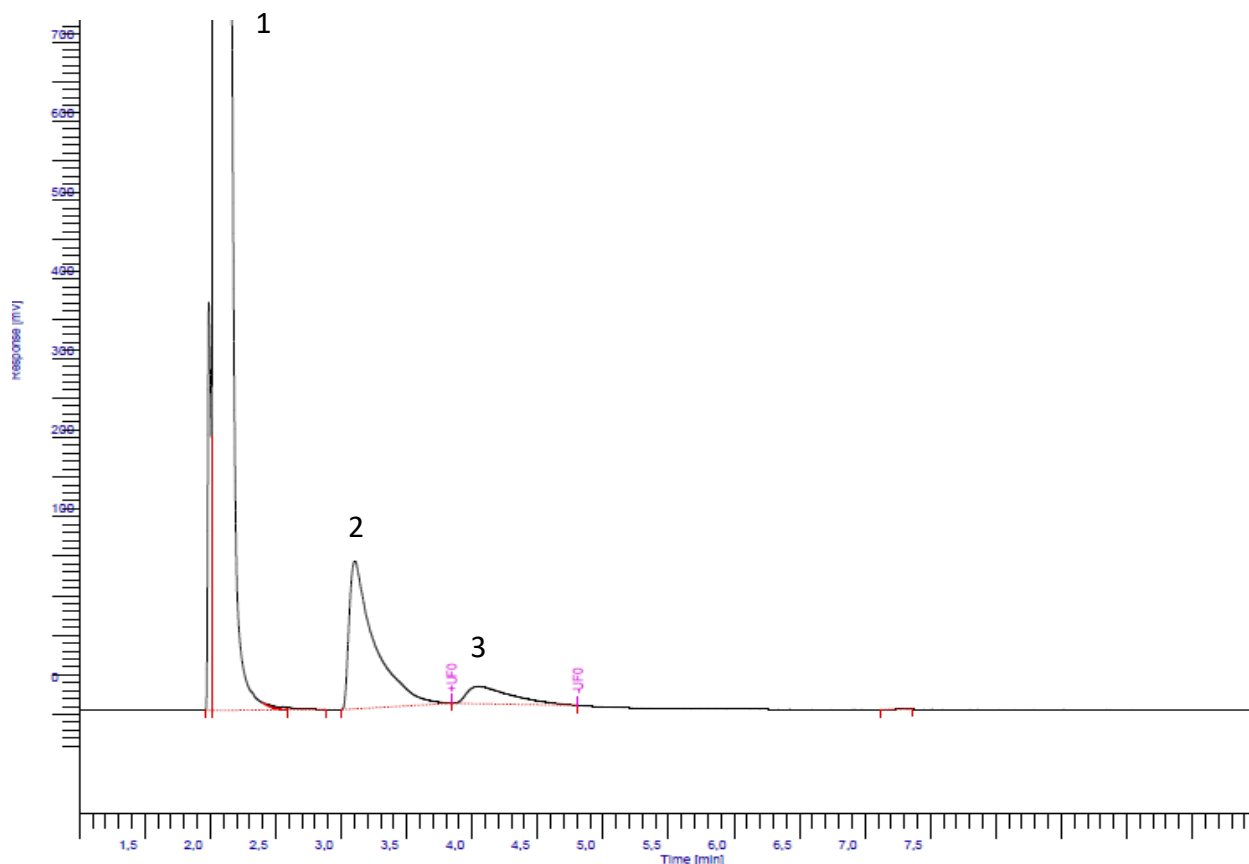
Figura 11: Curva padrão para quantificação de P(3HB).



O percentual de polímero P(3HB) em cada cultivo foi calculado a partir da Equação 1, onde X é a quantidade de biomassa.

$$\%P(3HB) = \frac{P(3HB) \times 100}{X} \quad (1)$$

Figura 12: Exemplo de cromatograma relativo à amostra padrão de P(3HB). Sendo o pico 1 referente ao dicloroetano, o pico 2 referente ao polímero P(3HB) e o pico 3 referente ao pico do padrão ácido benzoico



3.2.8 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada no software Past, utilizando a metodologia de análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey, com grau de confiança de 95 %. O teste foi aplicado somente para as linhas, sendo que diferentes letras em uma mesma linha ilustram resultados com diferença significativa. Quando duas letras estão juntas é porque esse resultado não difere significativamente com nenhum correspondente àquelas letras.

4 Resultados e Discussão

4.1 Açúcares nos substratos

Para caracterização do substrato a ser utilizado nos cultivos, realizou-se análise de açúcares em HPLC. Foram obtidos os resultados descritos na Tabela 8.

Tabela 8: Concentração de diferentes tipos de açúcares por substrato avaliado.

Fonte de carbono	Glicose	Lactose	Frutose	Galactose	Total
Resíduo Florybal (g·L ⁻¹)*	1,09	0,31	0,99	-	2,39
Resíduo Florestal (g·L ⁻¹)	5,73	-	4,13	-	9,86
Permeado de leite (g·L ⁻¹)	0,53	1,10	-	1,12	2,75

*Partindo de uma concentração de chocolate no extrato aquoso de 4,87 g·L⁻¹.

Em relação ao resíduo da indústria de chocolates Florybal, em valores percentuais, a glicose corresponde à 22 % da massa total de chocolate, enquanto a lactose representa 6 % e a frutose 20 %, totalizando em aproximadamente 49 % de açúcares na massa de resíduo de chocolate.

Na amostra de permeado de leite da empresa Santa Clara encontrou-se uma quantidade muito pequena de açúcares, apenas 2,75 g·L⁻¹, sendo que o usual é o permeado de leite apresentar em torno de 84 % de lactose (ZADOW, 1984) em sua composição. Isso pode ter ocorrido devido consumo por microrganismos durante transporte e armazenagem até o período de utilização para os cultivos, também evidenciado pelo valor inicial do pH antes da correção que era menor que 4.

4.2 Testes de precipitação

Para minimizar o erro de quantificação de biomassa e de percentual de P(3HB) obtido, realizou-se a determinação de sólidos suspensos conforme descrito na metodologia. Após realização de testes de precipitação em centrífuga, foram obtidos os resultados de massa de precipitado apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Massa de precipitado obtida após centrifugação do substrato antes do cultivo.

Fonte de carbono	Massa de precipitado (g)
Resíduo Florestal	0,0043 ± 0,0001
Permeado com enzima	0,0021 ± 0,0003
Permeado sem enzima	0,0032 ± 0,0002

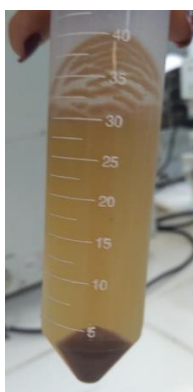
A massa de precipitado obtida foi subtraída no cálculo de biomassa após cultivo dos substratos devido apresentação de massa sólida no meio utilizado para os cultivos.

4.2.1 Teste de precipitação no resíduo industrial da empresa Florybal

Em relação ao resíduo da indústria de chocolates Florybal foram observados resultados bem distintos ao comparar os métodos de centrifugação e banho de gelo para remoção do excesso de cacau e gordura que o extrato do substrato contém.

O método de centrifugação do extrato de chocolate resultou em uma maior remoção do cacau e dos ácidos graxos contidos no substrato, já que a massa de precipitado remanescente após a etapa de remoção dos sólidos resultou em menor quantidade, conforme resultados da Tabela 10. Após o método de centrifugação, observou-se uma massa de cacau precipitada, enquanto a gordura formou uma película sobrenadante (Figura 13).

Figura 13: Extrato após centrifugação com película de gordura sobrenadante e precipitado de cacau.



A partir dos resultados obtidos, optou-se por utilizar o método de centrifugação para remoção do cacau e gordura do extrato de chocolate Florybal, pois, dessa forma, é minimizada a interferência que essa massa poderia causar nos valores de biomassa e porcentagem final de P(3HB) obtida, a Figura 14 ilustra a diferença visual na quantidade de precipitado remanescente pelos diferentes métodos. Para fins de estimativa da quantidade de precipitado de cacau para os cultivos de resíduo de chocolate Florybal sem centrifugação prévia, foi feita uma média entre a quantidade precipitada obtida por ambos os métodos.

Tabela 10: Métodos de remoção do cacau e massa final obtida de precipitado após centrifugação.

Metodologia	Massa de precipitado remanescente (g)
Centrifugação	$0,009 \pm 0,001$
Banho de gelo	$0,126 \pm 0,005$

Figura 14: Resultado da precipitação de cacau após métodos de a) banho de gelo b) centrifugação.

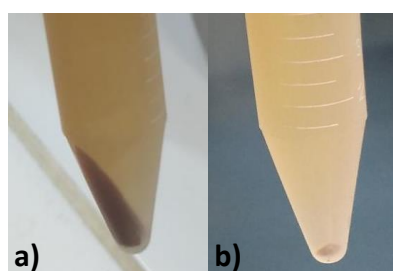


Tabela 11: Açúcares resultantes do sobrenadante após testes de remoção de cacau e ácidos graxos a partir de uma concentração inicial de $32,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de chocolate.

Açúcar	Centrifugação	Banho de Gelo
Glicose ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$8,1 \pm 0,3$	$7,8 \pm 0,4$
Lactose ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$2,31 \pm 0,08$	$2,2 \pm 0,1$
Frutose ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$7,4 \pm 0,2$	$7,1 \pm 0,4$

Os resultados da análise de açúcares contidos no sobrenadante obtido após os métodos de remoção de cacau e ácidos graxos, apresentados na Tabela 11, indicam que não ocorreu perda de açúcar durante a remoção destes componentes, uma vez que a quantidade de açúcares totais no teste de centrifugação representa 55 % da massa inicial de chocolate e no teste envolvendo banho de gelo, os açúcares totais representam 52 % da massa inicial de chocolate. O resultado da análise em HPLC mostrados na Tabela 8 indicam que o percentual de massa aproximado de açúcar na massa de chocolate é 49 %, as diferenças nos percentuais podem ser devido à heterogeneidade da massa de chocolate. Como os resultados obtidos foram bem próximos, indicam que não houve perda significativa de açúcares para a massa precipitada.

4.3 Açúcares após cultivos

Os resultados exibidos na Tabela 12 ilustram um grande consumo da glicose no resíduo da indústria Florestal. A concentração de açúcar em 28 h está muito próxima de 0, indicando que o tempo de cultivo está adequado, não sendo necessário um tempo maior de cultivo. Em relação aos permeados de leite, tanto com enzima quanto sem enzima, como a concentração inicial de açúcares é bastante baixa, 20 h de cultivo já foram suficientes para a produção ocorrer e os valores de açúcares remanescentes nesses dois meios não tiveram diferença significativa entre todos os tempos avaliados. A concentração de açúcares nos resíduos provenientes da indústria Florybal ilustram que o consumo da glicose, frutose e lactose foi bastante baixo, o que explica a baixa quantidade de biomassa obtida nesses cultivos. Uma das razões para esse baixo consumo, e consequente baixa produção, pode ser a ausência de suplementação de micronutrientes e, conforme já mencionado, a razão carbono/nitrogênio escolhido pode não ter sido adequada para esse cultivo, uma vez que suas características diferem muito do cultivo de meio mineral. Os resultados de glicose e frutose remanescentes no cultivo de meio mineral ilustram um alto consumo desses açúcares nas primeiras 20 horas e após esse tempo decorrido não há diferença significativa no consumo.

Tabela 12: Concentração ao longo do tempo dos diferentes tipos de açúcares após produção, sendo C0 a concentração inicial do açúcar no substrato.

Substrato	C0	Açúcar	20 h	24 h	28 h	48 h
Resíduo Florestal (g·L ⁻¹)	5,8 ^a ± 0,1	Glicose	2,9 ^b ± 0,6	0,54 ^c ± 0,01	0,5 ^c ± 0,3	-
	4,2 ^a ± 0,1	Frutose	4,9 ^a ± 0,8	2,7 ^b ± 0,3	1,3 ^b ± 0,3	-
Permeado de leite com enzima (g·L ⁻¹)	1,1 ^{a*}	Lactose	0,5 ^b ± 0,05	0,51 ^b ± 0,01	0,5 ^b ± 0,03	-
	1,12 ^{a*}	Galactose	0,75 ^b ± 0,04	0,78 ^b ± 0,04	0,74 ^b ± 0,06	-
Permeado de leite sem enzima (g·L ⁻¹)	1,1 ^{a*}	Lactose	0,87 ^b ± 0,06	0,92 ^b ± 0,01	0,92 ^b ± 0,04	-
	1,12 ^{a*}	Galactose	0,6 ^b ± 0,1	0,73 ^b ± 0,01	0,74 ^b ± 0,05	-
Resíduo Florybal (g·L ⁻¹)	8,1 ^a ± 0,3	Glicose	7,7 ^a ± 0,4	5,6 ^a ± 0,4	6 ^a ± 2	5,7 ^a ± 0,5
	7,4 ^a ± 0,2	Frutose	6,1 ^{ab} ± 0,5	4,2 ^b ± 0,4	4 ^b ± 2	3,7 ^b ± 0,3
	2,31 ^a ± 0,08	Lactose	1,8 ^{ab} ± 0,2	1,28 ^{ab} ± 0,08	1,3 ^b ± 0,5	1,455 ^b ± 0,002
Florybal centrifugado (g·L ⁻¹)	8,1 ^a ± 0,3	Glicose	7 ^a ± 1	5,6 ^a ± 0,9	6,11 ^a ± 0,04	6,4 ^a ± 0,1
	7,4 ^a ± 0,2	Frutose	6,3 ^{ab} ± 0,7	4,7 ^b ± 0,7	5,05 ^b ± 0,03	4,8 ^b ± 0,1
	2,31 ^a ± 0,08	Lactose	1,6 ^b ± 0,1	1,2 ^b ± 0,2	1,292 ^b ± 0,005	1,39 ^b ± 0,02
Meio mineral (g·L ⁻¹)	16 ^{**}	Glicose	3,2 ^a ± 0,2	2,6 ^a ± 0,3	2,38 ^a ± 0,06	-
		Frutose	2,5 ^a ± 0,2	2,3 ^a ± 0,3	2,09 ^a ± 0,06	-

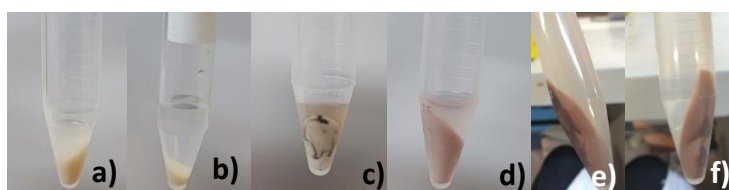
*Não foi realizada duplicata

**Não foi quantificado de forma separada entre glicose e frutose, apenas açúcares totais

4.4 Crescimento celular

Após o cultivo, foi observado crescimento celular em todas as fontes de carbono avaliadas, conforme pode ser visualizado na Figura 15. Foram analisados valores de biomassa em cada tempo de cultivo. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 13. Também foram analisados os valores de pH dos sobrenadantes dos meios de cultivo. Os resultados obtidos após medição do pH estão apresentados na Tabela 14.

Figura 15: Biomassa observada nos diversos meios de cultivo, sendo a) permeado com enzima b) permeado sem enzima c) resíduo da indústria de doces Florestal d) sacarose e) resíduo da indústria de chocolate Florybal sem centrifugar o extrato f) resíduo da indústria de chocolate Florybal com extrato centrifugado.



No decorrer do cultivo foi possível observar turbidez das soluções devido ao crescimento celular. Adicionalmente, foi notado um odor característico do crescimento da bactéria *P. megaterium*.

Tabela 13: Quantidade de biomassa obtida em peso seco ao longo do tempo. C0 é a quantidade de açúcares inicial.

Fonte de carbono	C0 açúcares (g·L ⁻¹)	20 h (g·L ⁻¹)	24 h (g·L ⁻¹)	28 h (g·L ⁻¹)	48 h (g·L ⁻¹)
Meio mineral	16	4,5 ^a ± 0,2	4,2 ^a ± 0,3	4,25 ^a ± 0,07	-
Efluente Florestal	9,86	2,04 ^a ± 0,09	2,60 ^b ± 0,06	2,74 ^b ± 0,01	-
Permeado com enzima	2,75	1,07 ^a ± 0,08	1,1 ^a ± 0,2	1,12 ^a ± 0,03	-
Permeado sem enzima	2,75	0,4 ^a ± 0,2	0,20 ^a ± 0,02	0,13 ^a ± 0,09	-
Resíduo Florybal centrifuç	16	1,62 ^a ± 0,05	1,8 ^a ± 0,1	1,71 ^a ± 0,05	1,89 ^a ± 0,05
Resíduo Florybal	16	1,40 ^a ± 0,24	1,6 ^a ± 0,8	1,22 ^a ± 0,08	2,5 ^a ± 0,3

Tabela 14: Resultados de pH medidos ao longo do tempo.

Fonte de carbono	20 h	24 h	28 h	48 h
Meio mineral	4,64 ^a ± 0	4,41 ^b ± 0,07	4,39 ^b ± 0,04	-
Efluente Florestal	5,75 ^a ± 0,01	5,94 ^b ± 0,01	6,67 ^c ± 0,05	-
Permeado com enzima	6,65 ^a ± 0,15	6,9 ^{ab} ± 0,1	7,11 ^b ± 0,04	-
Permeado sem enzima	7,51 ^a ± 0,08	7,57 ^a ± 0,05	7,56 ^a ± 0,36	-
Resíduo Florybal centrifugado	4,69 ^a ± 0,01	4,63 ^b ± 0,00	4,62 ^b ± 0,02	4,50 ^c ± 0,00
Resíduo Florybal	4,60 ^a ± 0,04	4,60 ^{ab} ± 0,02	4,55 ^{ab} ± 0,02	4,4 ^b ± 0,1

A fonte de carbono sacarose em meio mineral, a qual foi utilizada como controle deste trabalho, resultou na maior quantidade de biomassa obtida após o cultivo, dentre os substratos avaliados. No entanto, a concentração inicial de sacarose também era maior dentre a quantidade disponível de açúcar no efluente Florestal e nos permeados. Além disso, essa foi a única fonte que foi corretamente suplementada, conforme descrito em Faccin (2007) na qual foi adicionada a solução de micronutrientes bem como continha sais com efeito tamponante.

Adicionalmente, foi observado que apesar do substrato permeado de leite não possuir uma quantidade grande de açúcares, os resultados apresentados na Tabela 13 indicam que a enzima lactase possibilitou a quebra da lactose em galactose e glicose, facilitando o consumo pela bactéria *P. megaterium* e resultando em uma maior quantidade de biomassa em relação ao permeado de leite sem enzima.

A partir dos resultados da Tabela 13 verifica-se que a produção a partir dos substratos meio mineral, permeados com enzima e sem enzima e resíduos de chocolate da Florybal não apresentaram diferença significativa com o passar do tempo, indicando que o crescimento celular ocorreu nas primeiras 20 horas de cultivo. No caso do meio mineral, um estudo realizado por Faccin (2007) já havia verificado que 20 h é o tempo necessário para ocorrer o máximo de produção de biomassa, entretanto, foi realizado o cultivo em tempos maiores (24 h e 28 h) para comparação com outros meios testados. No meio composto pelo efluente da Florestal observou-se diferença significativa entre 20 h e 24 h de cultivo, entretanto, entre 24 h e 28 h não foi observada diferença significativa, apontando que a produção celular ocorreu nas primeiras 24 horas de cultivo.

Em relação aos valores obtidos de pH, no substrato de meio mineral, foi observado uma tendência de diminuição do pH quanto maior o tempo de cultivo, além disso foi observada diferença significativa a partir de 24 h de cultivo. No substrato da indústria de doces Florestal foi observada uma tendência de aumento no pH com o aumento do tempo de cultivo, além de apresentar diferença significativa entre todos os tempos de cultivo analisados. O aumento de pH não é esperado para o cultivo deste microrganismo e pode indicar morte celular, ainda que em parte, possivelmente devido limitação de algum nutriente ou inibição por algum componente. Já no caso do permeado com enzima, o pH apresentou uma tendência de aumento e diferença significativa entre 20 h de cultivo e 28 h de cultivo. No caso do permeado com a enzima, os valores de pH permaneceram constantes e sem diferença significativa no tempo de cultivo. A medição dos valores de pH do cultivo a partir do resíduo Florybal, com extrato centrifugado previamente, indica que há uma tendência de queda nos valores de pH com o maior tempo cultivado, além disso, tempo entre 20 h e 24 h apresentam diferença significativa, assim como tempo entre 28 h e 48 h. E em relação ao cultivo com resíduo Florybal, com extrato concentrado, foi observada uma diminuição no valor de pH ao decorrer do tempo, sendo que entre 20 h e 48 h os valores apresentam diferença significativa. Vale ressaltar que todos os cultivos a partir de resíduos tiveram seus pH inicialmente corrigidos para pH 7 e o cultivo de meio mineral continha tampão.

A limitação de nitrogênio pode ser uma das causas da baixa produção de biomassa nos resíduos provenientes da indústria de chocolate Florybal, uma vez que a quantidade de sulfato de amônio utilizada foi de $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, baseado no estudo da melhor concentração de sulfato de amônio para o meio mineral. Um estudo realizado por Beaulieu et al., (1995) para investigar a influência dos sais de amônio e melaço de cana no crescimento de *Alcaligenes eutrophus* na produção de P(3HB) concluiu que em pH abaixo de 5,4 o crescimento celular foi descontinuado em concentrações acima de $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sais de amônio, já em concentrações abaixo desse valor, não houve inibição do crescimento celular ocasionado por pH baixo, entretanto, essas baixas concentrações de amônio no cultivo não foi capaz de sustentar crescimento celular por mais de 24 h. No estudo, o acúmulo de P(3HB) só iniciou após quantidade suficiente de nitrogênio para sustentar o crescimento. Ainda pode se atribuir a baixa produção à falta de suplementação de algum nutriente como ferro, magnésio, entre outros.

O fato de os resultados de pH a partir dos cultivos de permeado de leite tenham ficado praticamente constantes pode ser explicado a partir do estudo realizado por Koller et al. (2008), que verificaram a produção de PHAs por soro de leite utilizando *Pseudomonas hydrogenovora* e observaram que os valores de pH se mantiveram constantes em meio utilizando soro de leite e concluíram que uma justificativa para esse fato é que o leite possui uma alta capacidade de tamponamento natural.

4.5 Quantificação de P(3HB)

Conforme descrito no capítulo 3, após a propanólise, foram obtidos cromatogramas objetivando quantificação do polímero P(3HB) em cada cultivo. A partir dos cromatogramas obtidos (apresentado no Apêndice), é possível verificar o pico referente ao biopolímero P(3HB) em todas as amostras dos diferentes, apontando um potencial utilização desses resíduos industriais para produção deste polímero por *P. megaterium*.

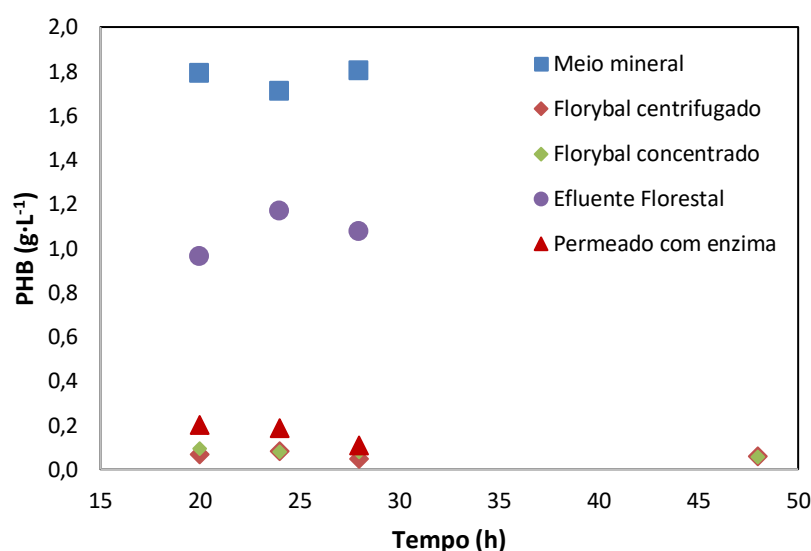
Nas amostras referentes aos cultivos utilizando o resíduo da indústria de chocolate da Florybal como fonte de carbono observa-se que o pico referente ao P(3HB) é menor que o pico referente ao padrão ácido benzoico, apontando uma pequena produção do biopolímero. Vale ressaltar que existe um erro inerente ao método, uma vez que parte da massa de células pesada para propanólise contém massa de chocolate, mesmo nas amostras utilizando o método de precipitação de cacau. Devido a isso, o percentual real de biopolímero é maior do que o obtido a partir da cromatografia gasosa. Na Tabela 15 está apresentado o percentual de P(3HB) obtido em cada meio de cultivo, em relação ao permeado de leite sem enzima, o cultivo não produziu quantidade suficiente de biomassa necessária para o processo de propanólise, devido a isso, os resultados desse cultivo não constam na Tabela 15. Na Figura 16 está ilustrada a curva de concentração do polímero na biomassa obtida em cada cultivo.

Tabela 15: Percentual obtido do polímero P(3HB) em cada cultivo.

Fonte de carbono	20 h	24 h	28 h	48 h
Meio mineral	40 ^a ± 7	41 ^a ± 0,4	42 ^a ± 1	-
Chocolate Florybal	5 ^a ± 2	5 *	4 ^a ± 1	2 ^a ± 2
Chocolate Florybal centrifugado	6 *	4 ^a ± 2	5 ^a ± 1	3 ^a ± 0,2
Efluente Florestal	47 ^a ± 11	45 ^a ± 1	39 ^a ± 1	-
Permeado com enzima	19 ^a ± 1	18 ^a ± 5	9 *	-

*Uma das amostras foi perdida durante o processo de propanólise.

Figura 16: Concentração obtida do biopolímero P(3HB) produzidos nas biomassas dos diferentes cultivos.



Uma das possíveis causas da baixa produção de P(3HB) nos resíduos da indústria de chocolate Florybal e de leite é que em nenhum dos cultivos testados foi suplementado com a solução de micronutrientes, como no meio mineral, como já mencionado anteriormente. Esse é um fator muito importante, conforme relatado por RamKumar Pandian et al., (2010) em seu estudo sobre otimização da produção de P(3HB) utilizando a água do mar, que concluíram que

os micronutrientes exercem efeito significativo na produção de P(3HB) e conseguiram obter de $0,19 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para $6,37 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de P(3HB) com o meio otimizado com esses nutrientes.

Em relação à produção de permeado com enzima, a produção de P(3HB) foi mantida constante no tempo entre 20 h e 24 h, não apresentando diferença significativa, no tempo de 28 h aparentemente houve um decréscimo na produção, porém a análise nesse tempo ficou prejudicada devido à perda de uma das amostras no processo de propanólise, a qual com o aumento da temperatura, houve aumento da pressão de vapor do álcool no interior do tubo, gerando ruptura da tampa e perda do álcool, inviabilizando a análise de cromatografia para essa amostra. O decréscimo na produção em 28 h de cultivo pode ter sido ocasionado pelo consumo do P(3HB) pela bactéria *P. megaterium*, de acordo com Slepecky e Law, (1961), se existirem condições favoráveis, pode ocorrer a utilização do polímero como fonte de nutriente no processo de esporulação da *P. megaterium*, pois é um processo que requer energia. Então, uma das razões para a baixa produção em 28 h pode ser que a falta de micronutrientes, e/ou incorreta razão nitrogênio/carbono tornou o meio propício para o consumo do P(3HB) e ocorrência de esporulação.

O efluente da indústria de doces Florestal obteve uma produção muito próxima ao cultivo controle (meio mineral), mesmo com quantidade inicial de açúcares menor que o cultivo de meio mineral, indicando um forte potencial desse efluente para produção de P(3HB) por *P. megaterium*. Além disso, esse efluente também não foi suplementado com solução de micronutrientes, proporcionando redução de custos e maior simplicidade no processo.

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

Esse trabalho avaliou a produção do biopolímero P(3HB) e de biomassa a partir de diversos resíduos industriais utilizados como fonte de carbono para a bactéria *P. megaterium*. Cabe ressaltar que para efluentes industriais foi adicionado apenas sulfato de amônio (fonte de nitrogênio) sem suplementação de nenhum outro nutriente. Foram avaliados os cultivos em estufa incubadora rotatória com tempos de cultivo de 20 h, 24 h, 28 h e 48 h (esse último, no caso do resíduo proveniente da indústria Florybal). Em relação aos açúcares remanescentes após cultivo dos meios, verificou-se que houve grande consumo da sacarose no cultivo utilizando o meio mineral como substrato, no caso do efluente da indústria Florestal, houve um consumo acentuado de glicose e frutose a partir de 24 horas de cultivo. Nos outros meios analisados não houve diferença significativa no tempo de produção, sugerindo que algum parâmetro como incorreta razão carbono/nitrogênio, falta de suplementação de micronutrientes pode ter afetado o consumo dos açúcares. De forma coerente ao consumo de açúcares, houve grande produção de biomassa no cultivo de meio mineral e no cultivo do efluente Florestal e pouco crescimento celular a partir dos cultivos do resíduo Florybal e permeados, sendo que o permeado sem enzima apresentou produção ainda menor, uma vez que a enzima lactase é capaz de quebrar a lactose em galactose e glicose, sendo, dessa forma, facilitado o consumo desses açúcares pela bactéria. As maiores produções de P(3HB) foram a partir do meio mineral (utilizado como meio ideal) e do efluente da Florestal, uma produção intermediária ocorreu a partir do permeado de leite e baixa produção obtida a partir do resíduo da indústria de chocolate Florybal.

Deste modo o presente trabalho verificou que em todos os meios utilizados foi possível a produção de P(3HB) por *P. megaterium* mesmo sem suplementação de macro ou micronutrientes, indicando grande potencial desses resíduos para reduzir o custo de produção do biopolímero, uma vez que o custo do substrato corresponde a um grande percentual nesse custo. Portanto, a utilização desses resíduos industriais tem potencial de viabilizar esse processo, pois além de possibilitar que esses biopolímeros possam ser produzidos a menor custo, contribuindo que futuramente, os polímeros petroquímicos sejam substituídos, em parte, por esses polímeros biodegradáveis, ainda têm o papel de auxiliar no tratamento destes resíduos que seriam destinados para descarte em Estações de Tratamento de Esgoto.

Como sugestões de trabalhos futuros para resolver alguns problemas na produção do P(3HB) e otimizar a quantidade produzida podem ser mencionadas:

- Desenvolvimento de metodologia para remoção do cacau do extrato utilizando resíduo de chocolate como substrato para remover o erro da quantidade de biomassa real obtida e possível erro na quantificação de ésteres após propanólise para quantificação de P(3HB) em análise por cromatografia gasosa;
- Avaliação da produção com a adição da solução de micronutrientes e macronutrientes para verificar se a baixa produção ocorreu devido à falta de suplementação;
- Produção de P(3HB) em cultivos contendo permeado de leite e resíduo da Florybal em tempos menores que 20 h para verificar o máximo de produção do polímero;

- Avaliação da quantidade de fonte de carbono adequada para otimização da produção em todos os cultivos.

6 Referências Bibliográficas

- ADELEYE, Aderemi T. *et al.* Sustainable synthesis and applications of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from biomass. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 96, p. 174–193, 2020. Acesso em: 19 ago. 2022.
- ANJUM, Anbreen *et al.* Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 89, p. 161–174, 2016. Acesso em: 19 mar. 2022.
- BEAULIEU, M. *et al.* Influence of Ammonium Salts and Cane Molasses on Growth of *Alcaligenes eutrophus* and Production of Polyhydroxybutyrate. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 165, 1995. Disponível em: [/pmc/articles/PMC1388323/?report=abstract](#). Acesso em: 16 set. 2022.
- BEHERA, Shivananda *et al.* Polyhydroxyalkanoates, the bioplastics of microbial origin: Properties, biochemical synthesis, and their applications. **Chemosphere**, [s. l.], v. 294, p. 133723, 2022a. Acesso em: 26 mar. 2022.
- BELLINI, Silvia; TOMMASI, Tonia; FINO, Debora. Poly(3-hydroxybutyrate) biosynthesis by *Cupriavidus necator*: A review on waste substrates utilization for a circular economy approach. **Bioresource Technology Reports**, [s. l.], v. 17, p. 100985, 2022. Acesso em: 24 jun. 2022.
- CAL, Andrew J. *et al.* Production of polyhydroxyalkanoate copolymers containing 4-hydroxybutyrate in engineered *Bacillus megaterium*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 168, p. 86–92, 2021. Acesso em: 31 maio 2022.
- CHANPRATEEP, Suchada. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 110, n. 6, p. 621–632, 2010. Acesso em: 20 mar. 2022.
- CHOI, Jong il; LEE, Sang Yup. Process analysis and economic evaluation for Poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. **Bioprocess Engineering** **1997** **17:6**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 335–342, 1997. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s004490050394>. Acesso em: 19 ago. 2022.
- CZERNIECKA-KUBICKA, Anna *et al.* Thermal properties of poly(3-hydroxybutyrate) modified by nanoclay. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [s. l.], v. 128, n. 3, p. 1513–1526, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10973-016-6039-9>. Acesso em: 9 jul. 2022.
- DUTT TRIPATHI, Abhishek *et al.* Production of polyhydroxyalkanoates using dairy processing waste – A review. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 326, p. 124735, 2021. Acesso em: 19 mar. 2022.
- FACCIN, Debora Jung Luvizetto. **Cultivo da bactéria *Bacillus megaterium* para a produção do biopolímero poli(3-hidroxibutirato) e modelagem matemática do bioprocesso**. 2007. 1–119 f. - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007. Acesso em: 17 set. 2022.

FRANCHETTI, Sandra Mara Martins; MARCONATO, José Carlos. Polímeros biodegradáveis - uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 811–816, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/qn/a/QXT9wMDfVQ9PrhbVsp8b3Pc/?lang=pt>. Acesso em: 16 set. 2022.

GOWDA, Vaishnavi; SHIVAKUMAR, Srividya. Agrowaste-based Polyhydroxyalkanoate (PHA) production using hydrolytic potential of *Bacillus thuringiensis* IAM 12077. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 55–61, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/babt/a/kPHBGtz4Rpmg4f5nc3sG8Gw/?lang=en>. Acesso em: 30 maio 2022.

GUPTA, Radhey S. *et al.* Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 70, n. 11, p. 5753–5798, 2020. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.004475>. Acesso em: 19 set. 2022.

HASSEMER, Guilherme de Souza *et al.* Production of poly(3-hydroxybutyrate) (p(3hb)) from different agroindustry byproducts by *Bacillus megaterium*. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 14278–14289, 2021. Disponível em: Acesso em: 24 maio 2022.

KHATAMI, Kasra *et al.* Waste to bioplastics: How close are we to sustainable polyhydroxyalkanoates production?. **Waste Management**, [s. l.], v. 119, p. 374–388, 2021. Acesso em: 19 mar. 2022.

KOLLER, Martin *et al.* Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 99, n. 11, p. 4854–4863, 2008. Acesso em: 16 set. 2022.

LEE, Sang Yup. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 49, 1996a. Acesso em: 19 mar. 2022.

LEE, Sang Yup. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 431–438, 1996b. Acesso em: 19 mar. 2022.

LI, Zibiao; YANG, Jing; LOH, Xian Jun. Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. **NPG Asia Materials** 2016 8:4, [s. l.], v. 8, n. 4, p. e265–e265, 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/am201648>. Acesso em: 19 mar. 2022.

LÓPEZ, Jimmy A. *et al.* Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria. **Biotechnology and Bioprocess Engineering** 2012 17:2, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 250–258, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12257-011-0448-1>. Acesso em: 4 jun. 2022.

MOHANRASU, K. *et al.* Optimization of media components and culture conditions for polyhydroxyalkanoates production by *Bacillus megaterium*. **Fuel**, [s. l.], v. 271, p. 117522, 2020. Acesso em: 1 jun. 2022.

MOHAPATRA, S. *et al.* Comparative analysis of PHAs production by *Bacillus megaterium* Ouat 016 under submerged and solid-state fermentation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 1242–1250, 2020. Acesso em: 19 mar. 2022.

PAGE, William J. Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses culture. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 103, n. 2–4, p. 149–157, 1992. Acesso em: 27 maio 2022.

PAKALAPATI, Harshini *et al.* Development of polyhydroxyalkanoates production from waste feedstocks and applications. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 126, n. 3, p. 282–292, 2018. Acesso em: 20 set. 2022.

POSADA, John A. *et al.* Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 310–317, 2011. Acesso em: 24 jun. 2022.

RAMI REDDY TADI, Subbi *et al.* Recombinant production of poly-(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium* utilizing millet bran and rapeseed meal hydrolysates. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 326, p. 124800, 2021. Acesso em: 30 maio 2022.

RAMKUMAR PANDIAN, Sureshbabu *et al.* Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 101, n. 2, p. 705–711, 2010. Disponível em: Acesso em: 27 maio 2022.

SANHUEZA, Claudia *et al.* Polyhydroxyalkanoates as biomaterial for electrospun scaffolds. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 124, p. 102–110, 2019. Acesso em: 24 jun. 2022.

SHARMA, Vibhuti; SEHGAL, Rutika; GUPTA, Reena. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and Modifications. **Polymer**, [s. l.], v. 212, p. 123161, 2021. Acesso em: 24 jun. 2022.

SILVA, Amanda L.S. *et al.* SELEÇÃO POLIFÁSICA DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE POLIHIDROXIALCANOATOS. **Química Nova**, [s. l.], v. 39, n. 7, p. 782–788, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/qn/a/KYhHj5mLR5vkKfDL3vfDhqx/?lang=pt>. Acesso em: 19 ago. 2022.

SLEPECKY, Ralph A.; LAW, John H. SYNTHESIS AND DEGRADATION OF POLY- β -HYDROXYBUTYRIC ACID IN CONNECTION WITH SPORULATION OF BACILLUS MEGATERIUM . **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 82, n. 1, p. 37–42, 1961. Disponível em: <https://journals.asm.org/journal/jb>. Acesso em: 16 set. 2022.

THIRUMALA, M.; REDDY, Sultanpuram Vishnuvardhan; MAHMOOD, S. K. Production and characterization of PHB from two novel strains of Bacillus spp. isolated from soil and activated sludge. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 271–278, 2010. Disponível em: <https://academic.oup.com/jimb/article/37/3/271/5993926>. Acesso em: 3 jul. 2022.

VARY, Patricia S. *et al.* Bacillus megaterium-from simple soil bacterium to industrial protein production host. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 76, n. 5, p. 957–967, 2007. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-007-1089-3>. Acesso em: 31 maio 2022.

VOLOVA, Tatiana G. *et al.* Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates with Different Chemical Compositions and Their Biodegradability. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 73, n. 2, p. 353–367, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-016-0852-3>. Acesso em: 20 mar. 2022.

ZADOW, J. G. Lactose: Properties and Uses. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 67, n. 11, p. 2654–2679, 1984. Disponível em: Acesso em: 28 jun. 2022.

FACCIN, Debora Jung Luvizetto. **Avaliações de condições de cultivo para aumento da produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* e modelagem do bioprocesso**. 2012. 1–160 f. - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012. Acesso em: 17 set. 2022.

TARRAHI, Roshanak *et al.* Polyhydroxyalkanoates (PHA): From production to nanoarchitecture. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 146, p. 596–619, 2020. Disponível em: Acesso em: 1 out. 2022.

TAN, Dan *et al.* Grand Challenges for Industrializing Polyhydroxyalkanoates (PHAs). **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 39, n. 9, p. 953–963, 2021. Disponível em: Acesso em: 1 out. 2022.

Reducing Single-Use Plastic Pollution: A Unified Approach | United Nations
<https://www.un.org/en/un-chronicle/reducing-single-use-plastic-pollution-unified-approach>
Acesso em: 17 set. 2022.

Executive summary | Global Plastics Outlook : Policy Scenarios to 2060 | OECD iLibrary
<https://www.oecd-ilibrary.org/sites/aa1edf33-en/index.html?itemId=/content/publication/aa1edf33-en>. Acesso em: 17 set. 2022.

Brasil é o 4º país do mundo que mais gera lixo plástico | WWF Brasil
<https://www.wwf.org.br/?70222/Brasil-e-o-4-pais-do-mundo-que-mais-gera-lixo-plastico>
Acesso em: 17 set. 2022.

ANEXO A



Relatório de Análises - Nº 251/2022.1
Este relatório de análises cancela e substitui o
relatório 251/2022.0

Proposta Comercial: PC61/2021.1

Data de Publicação: 16/02/2022 17:07

Identificação Conta	
Cliente: Florestal Alimentos S/A	CNPJ/CPF: 91.155.259/0001-67
Contato: Débora Zimke	Telefone: (51) 3710-2088
Endereço: Rodovia BR 386, KM 343, nº 2230 - Montanha - Lajeado - Rio Grande do Sul - CEP: 95900-000 - Brazil	

Nº Amostra: 251-1/2022.1 - Dados da Coleta	
Tipo de Amostra: Efluente Líquido	
Data Coleta: 03/02/2022 11:05	Data Recebimento: 03/02/2022 18:41
Local de Coleta: Efluente Bruto	Condições Climáticas: Tempo Bom
Responsável pela Coleta: Laboratório	Observações: PA 251/2022

Resultados Analíticos

Amostragem				
Análise	Resultado	LQ	Referência	Data Análise
pH*	4,0	1,0 - 14,0	SMEWW - Método 4500 H B	03/02/2022
Temperatura da Amostra*	30 °C	2 - 40	SMEWW - Método 2550 B	03/02/2022
Temperatura do Ar*	30 °C	2 - 40	SMEWW - Método 2550 B	03/02/2022

Físico Químico				
Análise	Resultado	LQ	Referência	Data Análise
DQO*	14540,0 mg O ₂ /L	8,2	POPL 06	10/02/2022
DBO5*	6975,0 mg O ₂ /L	1,2	SMEWW - Método 5210 B	10/02/2022
Fósforo Total*	1,85 mg/L P	0,19	POPL 08	10/02/2022
Nitrogênio Total Kjeldahl*	10,9 mg/L N	3,7	SMEWW - Método 4500 Norg B	09/02/2022
Sólidos Suspensos Totais*	432,9 mg/L	3,1	SMEWW - Método 2540 D	10/02/2022
Surfactantes* (Substâncias tensoativas que reagem ao azul de metileno)	11,25 mg/L MBAS	0,09	POPL 24	04/02/2022
Óleos e Graxas Minerais*	62 mg/L	2	SMEWW - Método 5520 D e F	11/02/2022
Sólidos Sedimentáveis*	< 0,2 mL/L	0,2	SMEWW - Método 2540 F	10/02/2022

Microbiológico				
Análise	Resultado	LQ	Referência	Data Análise
Coliformes Termotolerantes*	220000,0 NMP/100 mL	1,8	SMEWW - Método 9221 E	04/02/2022

**Relatório de Análises - Nº 251/2022.1**

Este relatório de análises cancela e substitui o relatório 251/2022.0

Proposta Comercial: PC61/2021.1

Notas

Os resultados contidos neste laudo se aplicam somente à amostra ensaiada.
 Análises da Amostragem são realizadas no local da coleta (em campo).
 Análises Físico-Químicas e Microbiológicas são realizadas na sede do Laboratório LACQUA.
 Coletas realizadas pelo Laboratório LACQUA seguem os procedimentos do POPL 26 - Amostragem em Efluentes e Água Residuais, POPL 80 - Amostragem em Águas Tratadas e POPL 89 - Amostragem em Águas Brutas.
 Este relatório não pode ser reproduzido sem a aprovação do Laboratório LACQUA, exceto se for reproduzido na íntegra.
 Laboratório cadastrado na FEPAM CCLAAM N° 068/2019

Legendas

PA: Plano de Amostragem

NA: Não se aplica.

* Análise(s) reconhecida(s) pela Rede Metrológica RS, conforme NBR ISO/IEC 17025:2017

S: Análise Subcontratada

LQ: Limite de Quantificação.

SMEWW: *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 23rd. Edition.

As datas e horas apresentadas neste documento estão baseadas no fuso horário:(UTC-03:00) Brasília

Motivo da Revisão

Erro de digitação do resultado do pH.



Flávio Remi Rahmeier - Diretor
Responsável Técnico

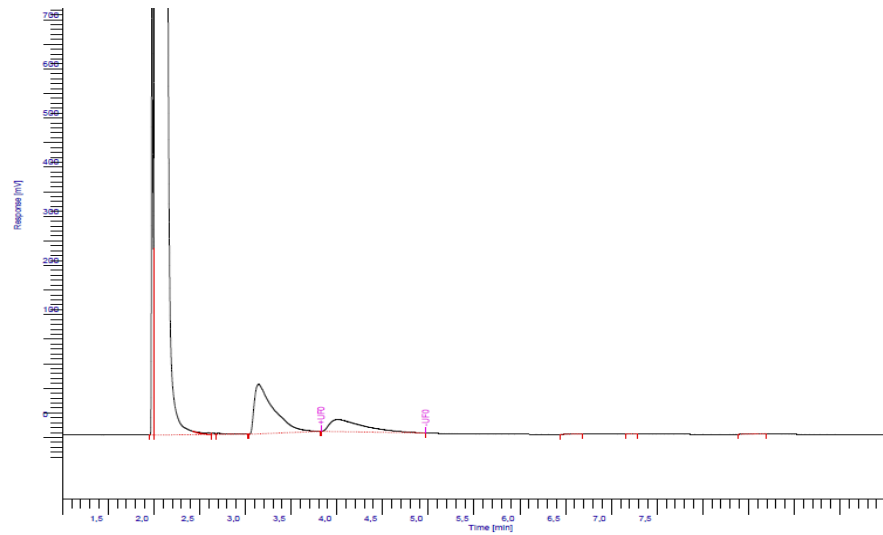


Chave de Validação: fef7c0e173a44008a2f71979c176171a

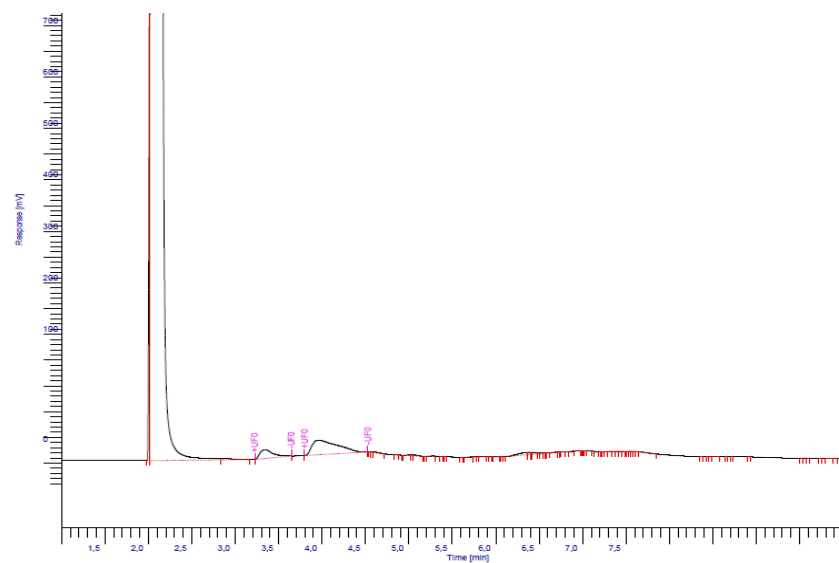
A validação deste documento pode ser realizada em: portal.mylimsweb.com.

APÊNDICES

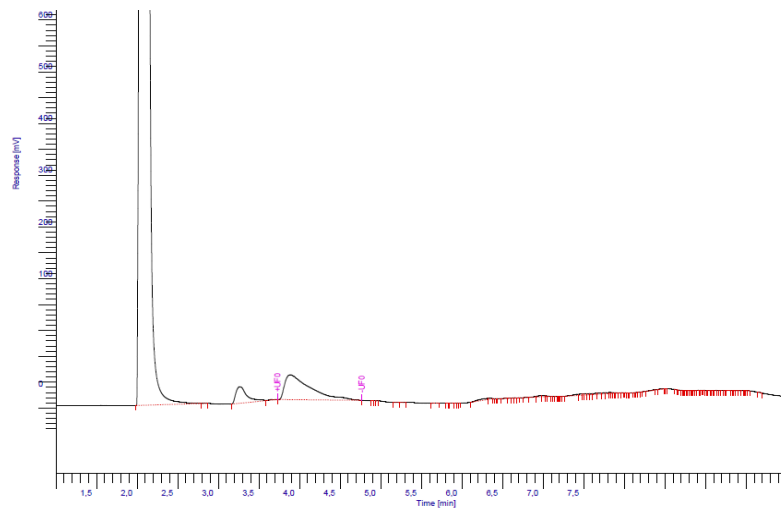
APÊNDICE A: Cromatograma referente à fonte de carbono meio mineral cultivada no tempo de 24 horas.



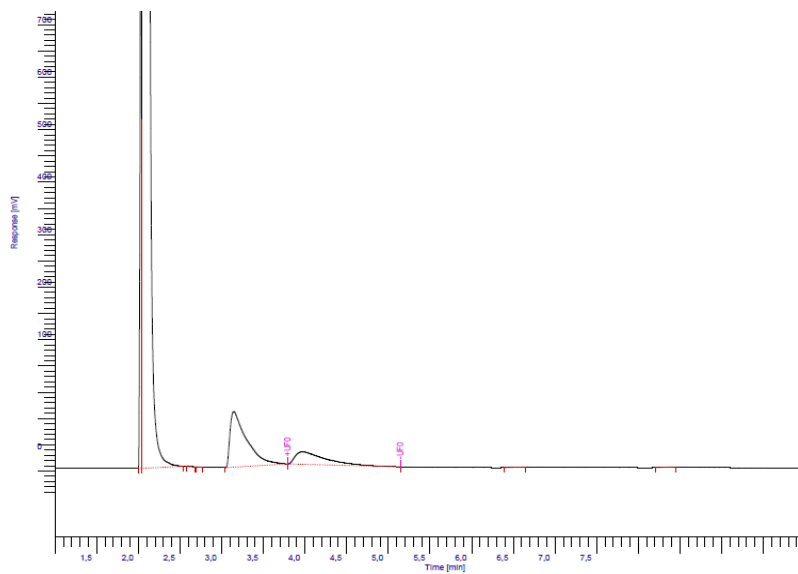
APÊNDICE B: Cromatograma referente à fonte de carbono resíduo Florybal cultivada no tempo de 24 horas.



APÊNDICE C: Cromatograma referente à fonte de carbono resíduo Florybal com extrato centrifugado cultivada no tempo de 24 horas.



APÊNDICE D: Cromatograma referente à fonte de carbono resíduo Florestal cultivada no tempo de 24 horas.



APÊNDICE E: Cromatograma referente à fonte de carbono resíduo permeado com enzima cultivada no tempo de 24 horas.

