

ADRIANA NAVARRO DA SILVA

**SUBSTRATOS ALTERNATIVOS PARA A PRODUÇÃO  
DE ALGINATO E POLI-HIDROXIBUTIRATO POR**  
*Azotobacter vinelandii*

Tese apresentada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos**, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

**Orientador:** Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz

São José do Rio Preto  
2012

Silva, Adriana Navarro da.  
Substratos alternativos para a produção de poli-hidroxibutirato e  
alginate por *Azotobacter vinelandii* / Adriana Navarro da Silva. - São  
José do Rio Preto : [s.n.], 2012.

102 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Crispin Humberto Garcia-Cruz  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de  
Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Alginato. 3. Poli-hidroxibutirato. 4.  
*Azotobacter vinelandii*. I. Garcia-Cruz, Crispin Humberto. II.  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biotecnologia, Letras e  
Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 579.84

ADRIANA NAVARRO DA SILVA

**SUBSTRATOS ALTERNATIVOS PARA A PRODUÇÃO  
DE ALGINATO E POLI-HIDROXIBUTIRATO POR**  
*Azotobacter vinelandii*

Tese apresentada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos**, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz  
Professor Titular  
UNESP – São José do Rio Preto/SP  
Orientador

Profa. Dra. Eleni Gomes  
Professora Livre Docente  
UNESP - São José do Rio Preto/SP

Prof. Dr. José Roberto Ernandes  
Professor Livre Docente  
UNESP – Araraquara/SP

Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha  
Professor Doutor  
UTFPR – Pato Branco/PR

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi  
Professor Doutor  
UNESP - São José do Rio Preto/SP

São José do Rio Preto, 16 de março de 2012.

Dedico este trabalho ao meu esposo *Israel* pelo apoio e incentivo cedidos incondicionalmente a todo o momento.

Ao meu filho *Kauan* que mesmo ainda em meu ventre já me dava forças para prosseguir o trabalho aqui demonstrado.

## **AGRADECIMENTOS**

*Primeiramente agradeço a Deus, obrigada pelas dádivas e pelas oportunidades de crescimento concedidas a cada dia; por seres o colo que me consola nos momentos mais difíceis; por seres a luz que me guia quando parece não haver saída; pelos inúmeros amigos que tens colocado em meu caminho e, sobretudo, por seres o amor de todos os que me apoiaram para chegar até aqui.*

*Ao meu esposo Israel que sempre e incondicionalmente me apoiou e me consolou carinhosamente em todos os momentos.*

*Aos meus pais, Celson e Lucinete, a quem devo a orientação de vida e que em sua sabedoria, mantiveram-se ao meu lado em todos os momentos de minha vida.*

*À minha irmã, Luciana, pelo companheirismo, carinho, amor, amizade e apoio.*

*Aos meus sogros, Florivaldo e Tânia, por incentivarem os meus estudos.*

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz pelo suporte a este trabalho.*

*À UNESP – São José do Rio Preto/SP e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa.*

*Aos professores do Curso de Pós-Graduação, pelos preciosos ensinamentos durante o desenvolvimento do meu doutorado.*

*Aos técnicos de laboratório Newton e principalmente à querida e amiga Tânia pela ajuda e dedicação.*

*A todos os meus amigos do Curso de Pós-Graduação, Gisele, Gabriel, Marina, Catharina...a todos que direta ou indiretamente participaram no processo de elaboração deste trabalho ou forneceram subsídios sentimentais e afetuosos durante esses anos.*

*Às minhas amigas, de ontem e hoje, do Laboratório de Biopolímeros, Bruna, Érico, Fernanda, Juliana, Karin, Marina, Micheli, Vidiany...muito obrigada pelo companheirismo e auxílio.*

*À CAPES pela bolsa de estudo.*

*Obrigada a todos.*

## **DADOS CURRICULARES**

### **ADRIANA NAVARRO DA SILVA**

NASCIMENTO	29/03/1984 – São José do Rio Preto/SP
FILIAÇÃO	Celson Cruz da Silva Lucinete Rodrigues Navarro da Silva
2002 - 2005	Curso de Graduação Química (Bacharelado e Licenciatura) Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP
2007 - 2009	Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, nível Mestrado, no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP
2009 - 2012	Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, nível Doutorado, no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	iv
RESUMO .....	1
1. INTRODUÇÃO .....	3
2. OBJETIVOS .....	5
2.1. GERAL.....	5
2.2. ESPECÍFICOS.....	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1. A BACTÉRIA <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	6
3.2. ALGINATO.....	7
3.2.1. Alginato de algas.....	7
3.2.2. Alginato bacteriano .....	8
3.2.3. Aplicações e características dos alginatos bacterianos .....	10
3.2.4. Biossíntese do alginato.....	13
3.2.5. Produção de alginato bacteriano .....	15
3.3. PLÁSTICOS .....	17
3.3.1. Plásticos convencionais .....	19
3.3.2. Bioplásticos ou plásticos biodegradáveis.....	19
3.4. POLI-HIDROXIALCANOATOS .....	21
3.4.1. Características dos poli-hidroxicanoatos.....	22
3.4.2. Aplicações dos poli-hidroxicanoatos .....	22
3.4.2.1. Aplicações médicas e farmacêuticas .....	22
3.4.2.2. Aplicações na agricultura .....	23
3.4.2.3. Aplicações em produtos de uso geral .....	24
3.4.3. Biossíntese do poli-hidroxicanoato .....	24
3.4.4. Produção de poli-hidroxicanoatos.....	27
3.4.5. Métodos de extração e determinação do PHA .....	28
3.4.6. Biodegradação de poli-hidroxicanoatos .....	30
3.5. PRODUÇÃO DE ALGINATO E POLI-HIDROXIBUTIRATO A PARTIR DE SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO .....	33
3.5.1. Glicerina.....	33
3.5.2. Vinhaça .....	35
3.5.3. Óleo residual de fritura .....	37
3.5.4. Manipueira .....	38
3.5.5. Água residual da indústria de refrigerante .....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	44
4.1. MICRORGANISMO.....	44
4.2. MEIOS DE CULTURA.....	44
4.2.1. Meio de Manutenção.....	44
4.2.2. Meios de Fermentação .....	44
4.2.2.1. Meio Mínimo ou Basal.....	45
4.2.2.2. Meio Mínimo ou Basal com glicerina P.A. e somente com glicerina P.A. ....	45
4.2.2.3. Meio Mínimo ou Basal com vinhaça e vinhaça <i>in natura</i> .....	45
4.2.2.4. Meio Mínimo ou Basal com óleo residual de fritura e óleo residual de fritura <i>in natura</i> .....	45
4.2.2.5. Meio Mínimo ou Basal com manipueira e manipueira <i>in natura</i> .....	46
4.2.2.6. Meio Mínimo ou Basal com água residual da indústria de refrigerante e água residual da indústria de refrigerante <i>in natura</i> .....	46
4.3. CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO .....	46
4.3.1. Ativação da cultura .....	46
4.3.2. Preparo do Inóculo.....	46



4.3.3. Fermentação e Produção do PHB e alginato.....	47
4.4. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO COM SUBSTRATOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	47
4.5. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO COM SUBSTRATOS <i>IN NATURA</i> .....	49
4.7. MÉTODOS ANALÍTICOS .....	50
4.7.1. Construção da curva de calibração para determinação da concentração celular a partir de suspensões de <i>Azotobacter vinelandii</i> CCT 2481 = DSM 85 .....	50
4.7.2. Determinação da biomassa.....	51
4.7.3. Processo de extração do PHB e alginato.....	51
4.7.4. Purificação do PHB e alginato .....	52
4.7.5. Determinação da pureza do PHB .....	52
4.7.6. Determinação de açúcares totais e redutores .....	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	54
5.1. GLICERINA.....	54
5.1.1. Glicerina em diferentes concentrações.....	54
5.1.2. Glicerina na concentração <i>in natura</i> .....	57
5.2. VINHAÇA.....	58
5.2.1. Vinhaça em diferentes concentrações .....	58
5.2.2. Vinhaça na concentração <i>in natura</i> .....	62
5.3. ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA .....	64
5.3.1. Óleo residual de fritura em diferentes concentrações .....	64
5.3.2. Óleo residual de fritura <i>in natura</i> .....	68
5.4. MANIPUEIRA .....	70
5.4.1. Manipueira em diferentes concentrações .....	70
5.4.2. Manipueira <i>in natura</i> .....	74
5.5. ÁGUA RESIDUAL DA INDÚSTRIA DE REFRIGERANTES .....	76
5.5.1. Água Residual da Indústria de Refrigerantes em diferentes concentrações .....	77
5.5.2. Água residual da indústria de refrigerantes <i>in natura</i> .....	79
6. CONCLUSÕES.....	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84
APÊNDICE .....	99

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura dos blocos homopoliméricos M- e G-, e dos blocos heteropoliméricos MG-, que constituem a molécula de alginato. Na parte superior da figura (A) tem-se uma seqüência M-M; no centro (B) uma seqüência G-G e na parte inferior da figura (C) uma seqüência M-G-M. Adaptado de Smidsrød (1970).*.....9
- Figura 2. Modelo caixa de ovos. Retirado de Braccini e Pérez (2001).*.....11
- Figura 3. Rota simplificada da biossíntese de alginato pela Azotobacter vinelandii. Adaptado de Trujillo-Roldan e colaboradores (2003).*.....14
- Figura 4. Genes envolvidos na biossíntese de alginato pela Azotobacter vinelandii.*.....15
- Figura 5. Estrutura química dos poli-hidroxicanoatos (PHAs): a) poli-hidroxitirato; b) poli-hidroxicaproato e, c) poli-hidroxitirato-co-caproato.*.....21
- Figura 6. Biossíntese do PHB e ciclo de Krebs na bactéria Azotobacter vinelandii.*.....25
- Figura 7. Genes envolvidos na biossíntese de PHB pela Azotobacter vinelandii.*.....26
- Figura 8. Reação de hidrólise enzimática da ligação éster por meio da enzima extracelular PHB depolimerase.*.....32
- Figura 9. Ciclo de carbono dos poli-hidroxicanoatos.*.....32
- Figura 10. Transesterificação de triacilglicerol, onde R' representam cadeias carbônicas dos ácidos graxos.*.....34
- Figura 11. Conversão enzimática da linamarina em cianidreto nos tecidos da mandioca. Retirado de Universidade de São Paulo (2011).*.....39
- Figura 12. Azotobacter vinelandii CCT 2481 mantida em agar YM.*.....44
- Figura 13. Precipitação do PHB com etanol absoluto.*.....51
- Figura 14. Precipitação do alginato com etanol absoluto.*.....52
- Figura 15. Perfil para predição de valores e desejabilidade (“Profiles for predicted values and desirability”) do planejamento experimental  $3^{(2-0)}$  para glicerina em diferentes concentrações.*.....55
- Figura 16. Superfícies de resposta para: (a) concentração de biomassa ( $g L^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e concentração de glicerina ( $g L^{-1}$ ) (equação:  $1,64 - 0,030 * x + 0,026 * y + 0,0006 * x * x + 0,0001 * x * y - 0,0006 * y * y$ ); (b) concentração de alginato ( $mg g$  de célula $^{-1} h^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e concentração de glicerina ( $g L^{-1}$ ) (equação:  $15,92 - 0,68 * x + 0,43 * y + 0,0088 * x * x - 0,019 * x * y + 0,016 * y * y$ ); (c) concentração de PHB ( $mg g$  de célula $^{-1} h^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e concentração de glicerina ( $g L^{-1}$ ) (equação:  $= 100,04 - 2,05 * x - 0,76 * y + 0,012 * x * x + 0,0008 * x * y + 0,012 * y * y$ ).*.....56
- Figura 17. Perfil para predição de valores e desejabilidade (“Profiles for predicted values and desirability”) do planejamento experimental  $3^{(2-0)}$  para vinhaça em diferentes concentrações.*.....60
- Figura 18. Superfícies de resposta para: (a) biomassa ( $g L^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e concentração de vinhaça ( $g L^{-1}$ ) (equação:  $-0,31 + 0,0025 * x + 0,14 * y - 8,9972E - 5 * x * x + 0,0001 * x * y - 0,0026 * y * y$ ); (b) concentração de alginato ( $mg g$  de célula $^{-1} h^{-1}$ ) ao redor dos*

valores ótimos de tempo de incubação (h) e concentração de vinhaça ( $g L^{-1}$ ) (equação:  $990,08-22,97*x+36,02*y+0,065*x*x+0,30*x*y-0,97*y*y$ ); (c) concentração de PHB ( $mg g de célula^{-1} h^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e concentração de vinhaça ( $g L^{-1}$ ) (equação:  $112,62-0,33*x-6,74*y+0,0028*x*x-0,0082*x*y+0,15*y*y$ ). .....61

Figura 19. Experimento com vinhaça in natura contendo os valores de alginato e poli-hidroxibutirato em função do tempo de incubação. O valor médio de biomassa, considerando todos os tempos de incubação, foi de  $0,85^+ / 0,18 g L^{-1}$ . .....63

Figura 20. Perfil para predição de valores e desejabilidade (“Profiles for predicted values and desirability”) do planejamento experimental  $3^{(2-0)}$  para óleo residual de fritura em diferentes concentrações. ....66

Figura 21. Superfícies de resposta para: (a) biomassa ( $g L^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e concentração de óleo residual de fritura ( $g L^{-1}$ ) (equação:  $1,47+0,0034*x-0,026*y-8,86E-5*x*x+9,40E-5*x*y+0,0004*y*y$ ); (b) concentração de alginato ( $mg g de célula^{-1} h^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e concentração de óleo residual de fritura ( $g L^{-1}$ ) (equação:  $171,11-10,28*x+6,04*y+0,15*x*x-0,21*x*y+0,15*y*y$ ); (c) concentração de PHB ( $mg g de célula^{-1} h^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e concentração de óleo residual de fritura ( $g L^{-1}$ ) (equação:  $35,09-1,45*x+0,44*y+0,014*x*x-0,0012*x*y-0,0053*y*y$ ). .....67

Figura 22. Experimento com óleo residual de fritura in natura contendo os valores de alginato e poli-hidroxibutirato em função do tempo de incubação. O valor médio de biomassa, considerando todos os tempos de incubação, foi de  $1,26^+ / 0,24 g L^{-1}$ . .....69

Figura 23. Perfil para predição de valores e desejabilidade (“Profiles for predicted values and desirability”) do planejamento experimental  $3^{(2-0)}$  para manipueira em diferentes concentrações. ....72

Figura 24. Superfícies de resposta para: (a) biomassa ( $g L^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e concentração de manipueira ( $g L^{-1}$ ) (equação:  $0,24+0,015*x+0,016*y-0,0001*x*x-2,66E-5*x*y-8,52E-5*y*y$ ); (b) concentração de alginato ( $mg g de célula^{-1} h^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e concentração de manipueira ( $g L^{-1}$ ) (equação:  $1075,84-28,56*x-18,00*y+0,25*x*x-0,019*x*y+0,32*y*y$ ); (c) concentração de PHB ( $mg g de célula^{-1} h^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e concentração de manipueira ( $g L^{-1}$ ) (equação:  $189,76-4,58*x-3,82*y+0,029*x*x+0,036*x*y+0,027*y*y$ ). .....73

Figura 25. Experimento com manipueira in natura contendo os valores de alginato e poli-hidroxibutirato em função do tempo de incubação. O valor médio de biomassa, considerando todos os tempos de incubação, foi de  $0,49^+ / 0,083 g L^{-1}$ . .....75

Figura 26. Perfil para predição de valores e desejabilidade (“Profiles for predicted values and desirability”) do planejamento experimental  $3^{(2-0)}$  para água residual da indústria de refrigerantes em diferentes concentrações. ....78

Figura 27. Superfícies de resposta para: (a) biomassa ( $g L^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e concentração de água residual da indústria de refrigerante ( $g L^{-1}$ ) (equação:  $0,85+0,0007*x+1,31*y-8,20E-5*x*x+0,0033*x*y-2,03*y*y$ ); (b) concentração de PHB ( $mg g de célula^{-1} h^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e concentração de água residual da indústria de refrigerante ( $g L^{-1}$ ) (equação:  $227,66-4,81*x-218,67*y+0,032*x*x+0,82*x*y+207,55*y*y$ ). Não houve produção de alginato. ....78

Figura 28. Experimento com água residual da indústria de refrigerante in natura contendo os valores de alginato e poli-hidroxibutirato em função do tempo de incubação. O valor médio de biomassa, considerando todos os tempos de incubação, foi de  $0,36^+ / 0,026 g L^{-1}$ . .....81

<i>Figura 29. Curva de calibração para determinação da biomassa. ....</i>	<i>100</i>
<i>Figura 30. Curva de calibração para determinação de poli-hidroxibutirato (PHB) pelo método de Law e Slepecky (1961).....</i>	<i>100</i>
<i>Figura 31. Curva de calibração para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi (1952) e Nelson (1944).....</i>	<i>101</i>
<i>Figura 32. Curva de calibração para determinação de açúcares totais pelo método descrito por Dubois e colaboradores (1956).....</i>	<i>101</i>

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1. Aplicações dos alginatos em alimentos.....</i>	<i>12</i>
<i>Continuação da Tabela 1. Aplicações dos alginatos em alimentos.....</i>	<i>13</i>
<i>Tabela 2. Apresentação de diversos tipos de plástico (siglas à esquerda, de origem inglesa).....</i>	<i>18</i>
<i>Tabela 3. Principais produtores de PHA no mundo (retirado de Posada et al., 2011).....</i>	<i>28</i>
<i>Tabela 4. Métodos de extração de PHA (adaptado de POSADA et al., 2011).....</i>	<i>29</i>
<i>Tabela 5. Caracterização do efluente da indústria de refrigerantes (SANTOS; RIBEIRO, 2005).....</i>	<i>42</i>
<i>Tabela 6. Variáveis independentes estudadas no planejamento experimental fatorial completo <math>3^{(2-0)}</math> para a água residual da indústria de refrigerante.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabela 7. Variáveis independentes estudadas no planejamento experimental fatorial completo <math>3^{(2-0)}</math> para as fontes de carbono: glicerina, vinhaça, óleo residual de fritura e manipueira.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 8. Delineamento experimental fatorial completo <math>3^{(2-0)}</math> para a água residual da indústria de refrigerante.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 9. Delineamento experimental fatorial completo <math>3^{(2-0)}</math> glicerina, vinhaça, óleo residual de fritura e manipueira.....</i>	<i>48</i>
<i>Continuação da Tabela 9. Delineamento experimental fatorial completo <math>3^{(2-0)}</math> glicerina, vinhaça, óleo residual de fritura e manipueira.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabela 10. Experimento para os substratos: glicerina, vinhaça, óleo residual de fritura, manipueira e água residual da indústria de refrigerante, todos na concentração in natura em diferentes tempos de incubação utilizado no estudo da biomassa, alginato e PHB.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabela 11. Planejamento experimental fatorial fracionado <math>3^{(2-0)}</math> para a glicerina em diferentes concentrações e diferentes tempos de incubação utilizado no estudo da biomassa, alginato e PHB com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente (<math>p &lt; 0,05</math>).....</i>	<i>54</i>
<i>Tabela 12. Pureza do PHB para o experimento <math>3^{(2-0)}</math> para glicerina em diferentes concentrações.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabela 13. Experimento para a glicerina in natura em diferentes tempos de incubação utilizado no estudo da biomassa, alginato e PHB.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabela 14. Planejamento experimental fatorial fracionado <math>3^{(2-0)}</math> para a vinhaça em diferentes concentrações e diferentes tempos de incubação utilizado no estudo da biomassa, alginato e PHB com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente (<math>p &lt; 0,05</math>).....</i>	<i>59</i>
<i>Tabela 15. Pureza do PHB para o experimento <math>3^{(2-0)}</math> para vinhaça em diferentes concentrações.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabela 16. Experimento para a vinhaça in natura em diferentes tempos de incubação utilizado no estudo da biomassa, alginato e PHB.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabela 17. Experimento para a vinhaça in natura e os valores da média e desvio padrão para biomassa, alginato e PHB nos diferentes tempos de incubação.....</i>	<i>63</i>

<i>Tabela 18. Pureza do PHB para o experimento com vinhaça in natura .....</i>	<i>64</i>
<i>Tabela 19. Planejamento experimental fatorial fracionado <math>3^{(2-0)}</math> para o óleo residual de fritura em diferentes concentrações e diferentes tempos de incubação utilizado no estudo da biomassa, alginato e PHB com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente (<math>\rho &lt; 0,05</math>) .....</i>	<i>65</i>
<i>Tabela 20. Pureza do PHB para o experimento <math>3^{(2-0)}</math> para óleo residual de fritura em diferentes concentrações.....</i>	<i>68</i>
<i>Tabela 21. Experimento para o óleo residual de fritura in natura em diferentes tempos de incubação utilizado no estudo da biomassa, alginato e PHB.....</i>	<i>68</i>
<i>Tabela 22. Experimento para o óleo residual de fritura in natura e os valores da média e desvio padrão para biomassa, alginato e PHB nos diferentes tempos de incubação.....</i>	<i>69</i>
<i>Tabela 23. Pureza do PHB para o experimento com óleo residual de fritura in natura .....</i>	<i>70</i>
<i>Tabela 24. Planejamento experimental fatorial fracionado <math>3^{(2-0)}</math> para a manipueira em diferentes concentrações e diferentes tempos de incubação utilizado no estudo da biomassa, alginato e PHB com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente (<math>\rho &lt; 0,05</math>).....</i>	<i>71</i>
<i>Tabela 25. Pureza do PHB para o experimento <math>3^{(2-0)}</math> para manipueira em diferentes concentrações ..</i>	<i>74</i>
<i>Tabela 26. Experimento para a manipueira in natura em diferentes tempos de incubação utilizado no estudo da biomassa, alginato e PHB .....</i>	<i>74</i>
<i>Continuação da Tabela 26. Experimento para a manipueira in natura em diferentes tempos de incubação utilizado no estudo da biomassa, alginato e PHB.....</i>	<i>75</i>
<i>Tabela 27. Experimento para a manipueira in natura e os valores da média e desvio padrão para biomassa, alginato e PHB nos diferentes tempos de incubação .....</i>	<i>75</i>
<i>Tabela 28. Pureza do PHB para o experimento com manipueira in natura.....</i>	<i>76</i>
<i>Tabela 29. Planejamento experimental fatorial fracionado <math>3^{(2-0)}</math> para a água residual da indústria de refrigerantes em diferentes concentrações e diferentes tempos de incubação utilizado no estudo da biomassa, alginato e PHB com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente (<math>\rho &lt; 0,05</math>) .....</i>	<i>77</i>
<i>Tabela 30. Pureza do PHB para o experimento <math>3^{(2-0)}</math> para água residual da indústria de refrigerante em diferentes concentrações .....</i>	<i>79</i>
<i>Tabela 31. Experimento para a água residual da indústria de refrigerante in natura em diferentes tempos de incubação utilizado no estudo da biomassa, alginato e PHB.....</i>	<i>80</i>
<i>Tabela 32. Experimento para a água residual da indústria de refrigerante in natura e os valores da média e desvio padrão para biomassa, alginato e PHB nos diferentes tempos de incubação .....</i>	<i>80</i>
<i>Tabela 33. Pureza do PHB para o experimento com água residual da indústria de refrigerante in natura .....</i>	<i>82</i>

## RESUMO

Atualmente a destinação do lixo é uma das grandes preocupações da organização urbana e os problemas ambientais causados pela produção e acúmulo de materiais plásticos de origem petroquímica têm incentivado muitos países a realizarem estudos de gerenciamento do volume de lixo sólido, incluindo a diminuição de resíduos plásticos por meio do desenvolvimento de bioplásticos. Os bioplásticos possuem propriedades semelhantes às dos plásticos convencionais e apresentam a vantagem de serem facilmente degradados pela ação de microrganismos no ambiente, podendo citar como exemplo os poli-hidroxicanoatos (PHA), dentre eles o poli-hidroxi-butilato (PHB). Estes polímeros podem representar até 80% da massa seca total da célula, tendo como característica principal a biodegradabilidade em solos e a biocompatibilidade com o tecido animal. Entre os microrganismos produtores de PHAs, a bactéria *Azotobacter vinelandii* pode acumular grandes quantidades de PHB intracelular com a vantagem de utilizar durante seu crescimento uma ampla variedade de açúcares como os encontrados em melaço de cana-de-açúcar, beterraba e xarope de milho, além de resíduos da suinocultura, agroindustriais, etc. Além do PHB, a bactéria *A. vinelandii* é capaz de produzir alginato, composto muito empregado na área de análogos de frutas ou produtos tipo imitação como: fatias de pimentão para recheios de azeitonas, imitação de anéis de cebola, imitações de caviar, carne, pescados, produtos marinhos, etc. Tendo em vista que os principais fatores limitantes para a produção de biopolímeros estão associados, principalmente, com os custos dos substratos e ao fato de que muitos microrganismos são patogênicos dificultando a sua aceitação pela comunidade em geral, este trabalho teve como objetivo utilizar subprodutos contaminantes do ambiente (óleo residual de fritura, glicerina, manipueira, vinhaça e água residual da indústria de bebidas gaseificadas ou refrigerantes) como substrato para a produção de poli-hidroxi-butilato e alginato pela bactéria não patogênica *Azotobacter vinelandii*. Foram realizadas fermentações submersas utilizando os substratos em diferentes concentrações, bem como na forma in natura, utilizando diferentes parâmetros de fermentação. Concluiu-se, que dentre os substratos avaliados a manipueira in natura é o substrato mais adequado para produção de ambos os polímeros estudados. Além da manipueira, a vinhaça e o óleo residual de fritura mostraram potencial para produção de alginato e poli-hidroxi-butilato por *Azotobacter vinelandii*. O trabalho mostrou, de forma inédita, a possibilidade de elevadas produtividades de alginato com a manipueira in natura, sendo uma alternativa de agregação comercial a este resíduo.

Palavras-chave: alginato, poli-hidroxi-butilato, *Azotobacter vinelandii*, fermentação.

## ABSTRACT

Currently, the waste disposal is a major concern of urban organization and the environmental problems caused by production and accumulation of petrochemical plastics have encouraged many countries to management studies of the solid waste volume, including the waste plastics reduction through the bioplastics development. Bioplastics have similar properties to conventional plastics and the advantage of being easily degraded by the microorganisms action in the environment, for example, poly-hydroxyalcanoatos (PHA), including poly-hydroxybutyrate (PHB). These polymers can represent up to 80% of total dry mass of the cell, having as main feature the biodegradability in soil and the biocompatibility with animal tissue. Among the microorganisms producing PHAs, the bacterium *Azotobacter vinelandii* can accumulate large amounts of intracellular PHB with the advantage that they grow a wide sugars variety like those found in molasses cane sugar, beet sugar and corn syrup, and swine waste, agribusiness, etc.. Besides the PHB, the bacterium *A. vinelandii* is able to produce alginate, a very useful compound in the similar area of type of fruit and imitation as sliced peppers for stuffing olives, onion rings imitation, caviar, meat, fish and marine products imitation, etc.. Given that the main limiting factors for the biopolymers production are mainly associated with the substrates costs and the fact that many microorganisms are pathogenic hindering its acceptance by the community in general, this study aimed to use the pollutant by-products environment (residual oil frying, glycerin, cassava wastewater – “manipueira”, vinasse and wastewater industry carbonated beverages or soft drinks) as a substrate for the poly-hydroxybutyrate and alginate production by non-pathogenic bacterium *Azotobacter vinelandii*. Fermentations were performed using the substrate immersed in different concentrations and in natura form, using different fermentation parameters. It was concluded that among the tested substrates manipueira in nature is more suitable for the production of both polymers studied. Besides manipueira, vinasse and the residual oil frying showed potential for the alginate and poly-hydroxybutyrate production by *Azotobacter vinelandii*. The study showed, in an unprecedented manner, the possibility of high alginate productivities with manipueira in natura, being an alternative to this residue commercial aggregation.

Keywords: alginate, polyhydroxybutyrate, *Azotobacter vinelandii*, fermentation.



## 1. INTRODUÇÃO

Muitos países estão realizando estudos de gerenciamento do volume de lixo sólido, incluindo a diminuição de resíduos plásticos por meio do desenvolvimento de bioplásticos devido aos problemas ambientais causados pela produção e acúmulo de materiais plásticos de origem petroquímica. Os bioplásticos possuem propriedades semelhantes às dos plásticos convencionais e apresentam a vantagem de serem facilmente degradados pela ação de microrganismos no ambiente, podendo citar como exemplo os poli-hidroxicarboxilatos (PHA), dentre eles o poli-hidroxiacetato (PHA), dentre eles o poli-hidroxiacetato (PHA), dentre eles o poli-hidroxiacetato (PHA), dentre eles o poli-hidroxiacetato (PHA), dentre eles o poli-hidroxiacetato (PHA). Estes polímeros são acumulados no citoplasma bacteriano como fonte de carbono e podem representar até 80% da massa seca total da célula. São polímeros 100% biodegradáveis e biocompatíveis. Muitos são os microrganismos produtores de PHAs. Entre estes, a bactéria *Azotobacter vinelandii* pode acumular grandes quantidades de PHB intracelular com a vantagem de utilizar, durante seu crescimento, uma ampla variedade de açúcares, como os encontrados em melaço de cana-de-açúcar, beterraba e xarope de milho, além de resíduos da suinocultura, agroindustriais, etc. Além do PHB, a bactéria *A. vinelandii* é capaz de produzir alginato, composto muito empregado na área de análogos de frutas ou produtos tipo imitação como: fatias de pimentão para recheios de azeitonas, imitação de anéis de cebola, imitações de caviar, carne, pescados, produtos marinhos, etc.

Atualmente, um dos grandes problemas da humanidade é a questão do lixo. Um dos resíduos em evidência é o óleo comestível utilizado em restaurantes, bares, lanchonetes, pastelarias, hotéis e residências. O problema se encontra na forma de descarte deste resíduo, uma vez que muitas residências jogam-no na rede de esgoto. Além de gerar muitos problemas de higiene e mau cheiro, os óleos e gorduras presentes na rede de esgoto causam o entupimento da mesma, bem como o mau funcionamento das estações de tratamento.

Outro problema ambiental é que a crescente cadeia produtiva do biodiesel no Brasil favoreceu a preocupação em utilizar os co-produtos oriundos deste setor, como por exemplo, a glicerina, já que de cada 1000 litros de biodiesel fabricados pelo processo de transesterificação, que agrega óleo vegetal ou gordura animal de várias origens e um tipo de álcool (o metanol, mais utilizado, ou etanol), sobram no final cerca de 100 litros de glicerina, sendo que estes não podem ser utilizados totalmente pelo mercado consumidor.

Outro tipo de resíduo abundante no Brasil é a manipueira, resíduo líquido gerado nas indústrias de processamento de mandioca que contém altas concentrações de matéria orgânica, notadamente carboidratos, que a torna um poluente de oneroso manejo para

estabilização, além de compostos cianogênicos e sais minerais. A preocupação com o resíduo manipueira é bastante significativa, já que a produção da farinha de mandioca gera entre 267 a 419 litros desse resíduo para cada tonelada de raiz processada. No mundo, mais de 80 países produzem mandioca, sendo que o Brasil participa com mais de 15% da produção mundial, com cerca de 25 milhões de toneladas de raízes.

Há também a preocupação com os resíduos gerados no setor sucroalcooleiro, pois o Brasil é o maior produtor mundial neste setor e a produção de cana-de-açúcar está concentrada na região centro-sul, sendo o Estado de São Paulo um dos principais pólos de produção. A agroindústria sucroalcooleira também contribui para o impacto ambiental com: a grande extensão de áreas monocultivadas pelas práticas agrícolas; uso de agrotóxicos; queimada da cana e pela disposição indiscriminada da vinhaça, cuja proporção média é de 13 litros de vinhaça para cada litro de álcool produzido.

Outra questão é o efluente gerado nas indústrias de refrigerantes, pois o Brasil está entre os campeões de industrialização e consumo de bebidas gaseificadas, sendo o terceiro maior produtor mundial de refrigerantes, com 11,5 bilhões de litros e faturamento médio anual de R\$ 12 bilhões, sendo superado apenas pelos Estados Unidos e México. O consumo nacional quintuplicou de 1992 a 2002 (com 69 litros por habitante no ano de 2002) ocupando a quarta colocação mundial, atrás de Estados Unidos, México e Alemanha.

Os principais impactos ambientais da fabricação de refrigerantes são: a elevada carga orgânica, a presença de sólidos em suspensão nos efluentes ou a geração de resíduos de rótulos e vasilhames danificados.

Tendo em vista que os principais fatores limitantes para a produção de biopolímeros estão associados com os custos de produção, principalmente com os custos dos substratos e ao fato de que muitos microrganismos são patogênicos dificultando a sua aceitação pela comunidade em geral, este trabalho tem como objetivo utilizar subprodutos (óleo residual de fritura, glicerina, manipueira, vinhaça e água residual da indústria de bebidas gaseificadas ou refrigerantes) como substrato alternativo para a produção de poli-hidroxitirato e alginato pela bactéria não patogênica *Azotobacter vinelandii*, de modo a agregar valor comercial a estes subprodutos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAL

- Produzir poli-hidroxibutirato (PHB) e alginato pela bactéria *Azotobacter vinelandii* utilizando glicerina, vinhaça (resíduo da produção sucroalcooleira), óleo residual de fritura, manipueira (resíduo do processamento da mandioca) e água residual da indústria de refrigerante como fontes de carbono, de modo, *in natura* e também adicionados de um meio mínimo rico em sais minerais (meio basal).

### 2.2. ESPECÍFICOS

- Realizar para cada fonte de carbono, em diferentes concentrações, fermentação submersa em agitador orbital rotatório por meio do planejamento estatístico fatorial completo  $3^{(2-0)}$  de modo a determinar a melhor fonte de carbono para a produção de alginato e poli-hidroxibutirato.
- Produzir o poli-hidroxibutirato e alginato em diferentes tempos de incubação em agitador orbital rotatório com os resíduos na concentração *in natura* de modo a determinar a melhor fonte de carbono para a produção de alginato e poli-hidroxibutirato.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. A BACTÉRIA *Azotobacter vinelandii*

As bactérias do gênero *Azotobacter* pertenciam à família Azotobacteriaceae, a qual foi recentemente incluída à família Pseudomonadaceae que compreende os gêneros *Azomonas*, *Azomonotrichon*, *Azorhizophilus*, *Azotobacter*, *Cellvibrio*, *Mesophilobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobacter*, *Rugamonas*, e *Serpens* (REDIERS; VANDERLEYDEN; DE MOT, 2004; CORNELIS, 2008).

A *Azotobacter vinelandii* é uma bactéria Gram-negativa que possui uma parede celular constituída de uma membrana externa e uma capa interna de peptidoglicano que contém ácido murâmico e mureína. Essas bactérias se reproduzem por fissão binária, vivem em solos e em água doce, possuem células ovóides e grandes com diâmetro de 1,5 a 2,0  $\mu\text{m}$ . Também podem apresentar como características o pleomorfismo, variando sua morfologia desde bacilos até células em forma de cocos (ALLMAN et al., 1990; VARGAS-GARCÍA et al., 2002; GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008; SILVA; GARCIA-CRUZ, 2010a; SILVA; GARCIA-CRUZ, 2010b).

As bactérias do gênero *Azotobacter* são quimio-organotróficas, utilizam diversos carboidratos, alcoóis e ácidos orgânicos como fontes de carbono (REDIERS; VANDERLEYDEN; DE MOT, 2004). Em vida livre, fixam em média 10 mg de nitrogênio por grama de carboidrato (glicose) consumido e para esta atividade requerem molibdênio que pode ser parcialmente substituído por vanádio, sendo este metabolismo energético muito importante para a agricultura (SETUBAL et al., 2009). Como fontes de nitrogênio podem utilizar nitrato, sais de amônio e certos aminoácidos. O pH ótimo de crescimento quando fixam nitrogênio é de 7,0-7,5. A reprodução da *Azotobacter vinelandii* depende do meio de cultura e das condições de cultivo utilizadas, assim como da fase de crescimento em que o microrganismo se encontra (ALLMAN et al., 1990). Caso nenhuma fonte de carbono esteja presente, a *A. vinelandii* sofrerá o processo de diferenciação para formar cistos que são resistentes à dessecação. Embora o processo de encistamento seja conhecido, há poucas informações sobre a rota biossintética que estão envolvidas e como estas são reguladas (SETUBAL et al., 2009).

As funções biológicas que se atribuem ao PHB presente na *A. vinelandii* são várias, sendo a principal a de constituir um material de reserva de carbono e energia para a célula

bacteriana, o qual pode ser utilizado em períodos de limitação de nutrientes no meio. Estes polímeros armazenam grandes quantidades de carbono que permanecem condensados em forma de grânulos intracelulares insolúveis sem afetar a pressão osmótica interna da célula (PAGE; KNOSP, 1989).

Outra das funções que se atribuem ao PHB na *A. vinelandii* está relacionada com a fixação biológica de nitrogênio, especificamente com a proteção da nitrogenase, garantindo a função respiratória da bactéria em ausência de uma fonte de carbono exógena ao privar a célula de uma fonte de energia e carbono rapidamente oxidável. Desse modo, permite-se manter uma taxa respiratória adequada evitando diminuir a concentração de oxigênio contribuindo, assim, à proteção desta enzima (PAGE; MANCHAK; RUDY, 1992; ALMEIDA et al., 2004).

A vantagem desta espécie é a produção do PHB durante seu crescimento, por meio da utilização de uma ampla variedade de açúcares como os encontrados em melação de cana-de-açúcar, beterraba e xarope de milho, por exemplo. Outra vantagem é a fácil obtenção desta bactéria, uma vez que *A. vinelandii* é encontrada em solos e também em água doce (PAGE; MANCHAK; RUDY, 1992).

## 3.2. ALGINATO

### 3.2.1. Alginato de algas

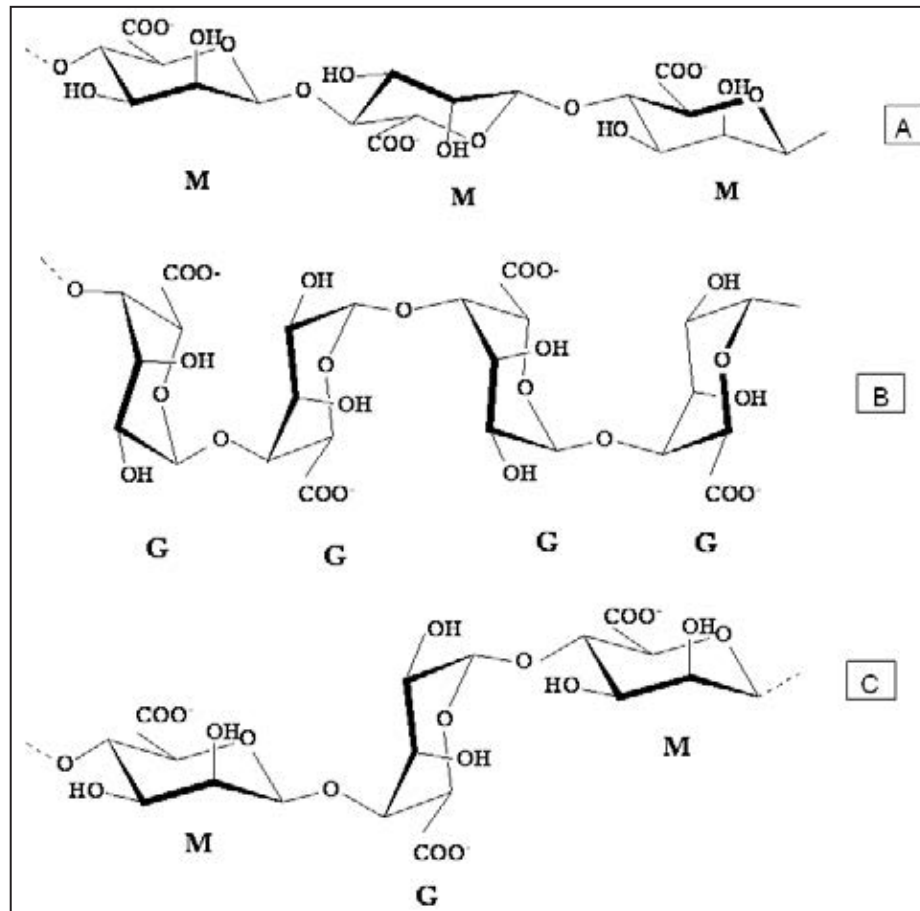
O alginato, composto por cadeias lineares de ácido  $\beta$ -D-manurônico e ácido  $\alpha$ -L-gulurônico, está presente na forma de um sal misto de cálcio, magnésio, sódio e potássio na composição estrutural de algas marrons (*Phaeophyceae*) representando até 40% da sua massa seca (DRAGET; SMIDSRØD; SKJÅK-BRÆK, 2005; SEGATO, 2007). Essas algas se constituem em uma família diversificada, crescem em praias rochosas ou nas áreas do oceano com fundo límpido e rochoso. Algumas espécies são encontradas ao nível da maré alta; outras ocorrem em um cinturão ao longo da praia em profundidade menor que 38 metros (o limite para a penetração da luz solar). Somente algumas espécies de algas marrons são utilizadas como fonte comercial de alginatos. A alga gigante *Macrocystis pyrifera*, que cresce abundantemente nas costas da América do Norte e do Sul, Nova Zelândia, Austrália e África, é a principal fonte de suprimento mundial de alginato. Também são utilizadas variedades de *Laminaria*, *Ecklonia* e *Aschophyllum nodosum*, as quais são também colhidas por alguns produtores. Essas diferentes espécies de algas marrons produzem alginatos com diferentes

proporções de ácido poligulurônico na estrutura, resultando assim em diferentes propriedades e funcionalidades destes compostos (GLICKSMAN, 1987).

O formaldeído é usualmente adicionado à alga marrom, pós-colheita, para evitar o crescimento microbiano durante sua estocagem e para fixar os polifenóis nas algas antes da extração do alginato. Sabendo que o formaldeído é tóxico, alergênico e possivelmente carcinogênico, a adição de sal na *Ascophyllum nodosum* (*Phaeophyceae*) foi testada como alternativa por Moen e colaboradores (1999). As algas foram colhidas na costa da Noruega, onde a salinidade é de aproximadamente 30‰ do final do outono até o começo da primavera, e estocadas a 22  $\pm$  2°C sob determinadas condições. Caso as amostras de algas sejam estocadas sem tratamento, ocorre a perda de sua qualidade, assim como do material para produção do alginato em até 14 dias. Os tratamentos com formaldeído (2% peso/peso) ou com 20% NaCl preservam as algas por até 46 dias, embora a técnica com NaCl seja menos agressiva, ainda é inconveniente e onerosa para a indústria do alginato, pois é necessário o controle de temperatura, pH, oxigênio, assim como do sal; fazendo com que o método mais utilizado comercialmente seja o de adição de formaldeído (MOEN et al., 1999).

### 3.2.2. Alginato bacteriano

A estrutura do ácido algínico consiste de cadeias lineares de resíduos de ácido  $\beta$ -D-manurônico (M) unidos por ligações tipo (1 $\rightarrow$ 4) e resíduos de seu epímero, o ácido  $\alpha$ -L-gulurônico (G), em várias proporções. Estes resíduos estão arranjados na forma de blocos de ácidos manurônico (M) ou gulurônico (G), ligados de forma que a seqüência destes resíduos na molécula seja alternada. A molécula deste polímero é constituída por blocos homopoliméricos, M- e G-, e por blocos heteropoliméricos MG- (Figura 1).



**Figura 1.** Estrutura dos blocos homopoliméricos M- e G-, e dos blocos heteropoliméricos MG-, que constituem a molécula de alginato. Na parte superior da figura (A) tem-se uma seqüência M-M; no centro (B) uma seqüência G-G e na parte inferior da figura (C) uma seqüência M-G-M. Adaptado de Smidsrød (1970).

As propriedades físico-químicas dos alginatos dependem da massa molecular, da proporção dos monômeros M:G ao longo da cadeia e também do grau de acetilação. Os alginatos são produzidos por bactérias e por algas marinhas marrons, sendo os resíduos de manuronato dos alginatos bacterianos acetilados nas posições O-2 e/ou O-3.

Embora as algas marinhas sejam, normalmente, a fonte comercial de alginatos, os de origem bacteriana vêm sendo sugeridos como possíveis substitutos para os alginatos de algas. Para este fim, estudos focaram inicialmente a bactéria patogênica oportunista *Pseudomonas aeruginosa*, e depois, três espécies não-patogênicas de *Pseudomonas*, incluindo *P. mendocina*, *P. putida*, e *P. fluorescens*, e ainda, a bactéria do solo *Azotobacter vinelandii* (BRIVONESE; SUTHERLAND, 1989). A maior parte do conhecimento sobre a genética da biossíntese de alginato se origina de estudos de *Pseudomonas aeruginosa*, principalmente por causa da relevância médica desta bactéria, como um importante microrganismo patogênico oportunista para humanos, em pacientes sofrendo de fibrose cística (ALKAWASH; SOOTHILL; SCHILLER, 2006; GOVAN; HARRIS, 1986; MAY; CHAKRABARTY, 1994).

Nesta, os alginatos têm papel importante como um fator de virulência. A razão para isto parece ser a formação de um biofilme de alginato, o qual facilita a colonização do pulmão (GACESA; RUSSELL, 1990).

*A. vinelandii* e *P. aeruginosa* produzem alginato como um polissacarídeo extracelular nas células vegetativas, enquanto que na produção de alginato por *A. vinelandii* está envolvido um processo de diferenciação levando ao assim chamado “cisto” (SADOFF, 1975). Este cisto é formado pelo acúmulo intracelular de poli-hidroxibutirato delimitado dentro do citoplasma por uma membrana lipoprotéica de parede dupla, quando a célula bacteriana se encontra num meio onde, em geral, há excesso de uma fonte de carbono e limitação de nitrogênio, fósforo ou oxigênio. Quando ocorre a exaustão da fonte de carbono, estes cistos oxidam de maneira rápida (por meio da ativação da enzima PHB depolimerase) e são utilizados como fontes de energia.

O potencial dos alginatos produzidos por bactérias, como polímeros industriais, é ainda um assunto controverso. Entretanto, a possibilidade de usar matérias-primas livres de variações sazonais e geográficas, e também cepas selecionadas, sob condições operacionais cuidadosamente controladas, de maneira a atender aplicações específicas em biotecnologia e biomedicina, pode ser suficiente para compensar a produção relativamente baixa, e grau de acetilação relativamente alto, dos polímeros bacterianos (CLEMENTI *et al.*, 1999).

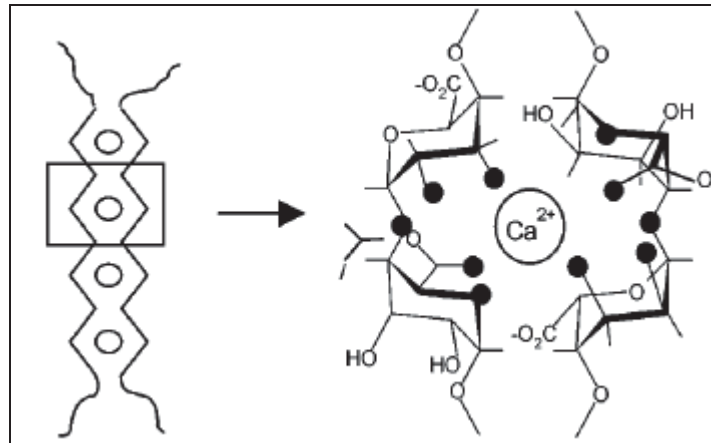
### 3.2.3. Aplicações e características dos alginatos bacterianos

A molécula de alginato quando em presença de íons divalentes, como os íons  $\text{Ca}^{2+}$ , tem a capacidade de formar gel, isto ocorre devido à interação do íon divalente com o ânion carboxilato e com os grupos hidroxilas das cadeias da molécula de guluronato (BRACCINI; PÉREZ, 2001) (Figura 2). Os géis de alginato são capazes de formar micro-leitos e incorporar enzimas ou células vivas inteiras, e esta aplicação tem despertado interesse na indústria de alimentos, na biotecnologia, e no setor biomédico (SMIDSRØD; SKJÅK-BRÆK, 1990; SABRA; ZENG; DECKWER, 2001).

Na indústria de alimentos, os alginatos são largamente utilizados como aditivos com a capacidade de aumentar a viscosidade, estabilizar, emulsificar e gelificar soluções aquosas (Tabela 1). A principal aplicação é na produção de sorvete, na qual é utilizado para prevenir a cristalização e o encolhimento, originando um produto homogêneo. Outra aplicação é em molhos para saladas, onde o alginato de sódio ou o éster de alginato de propilenoglicol (PGA) são usados como estabilizantes para evitar a separação de fases; com a mesma finalidade é



aplicado em maionese para estabilizar as emulsões fase água/óleo. Devido ao seu conteúdo calórico baixo (1,4 Kcal/g), estes polímeros podem ser usados como “agente de corpo” na formulação de produtos de baixa caloria, como maionese e massas (CLEMENTI, 1997).



**Figura 2.** Modelo caixa de ovos. Retirado de Braccini e Pérez (2001).

Os alginatos são muito empregados na área de análogos de frutas ou produtos tipo imitação. Em 1946, Peschardt patenteou um processo para fazer cerejas artificiais utilizando uma solução colorida e aromatizada de alginato em açúcar, que era adicionada em forma de gotas a uma solução coagulante de sais solúveis de cálcio. Uma película de alginato de cálcio insolúvel formava-se imediatamente em volta da superfície das gotas. Após mergulhá-las em uma solução de sais de cálcio, os íons penetravam por difusão em seu interior para fazer a gelificação. Vários tipos de texturas podiam ser obtidos através do controle adequado do tipo de sal de cálcio, concentração, tempo e temperatura, etc. Estas cerejas fabricadas não eram afetadas pelo calor e podiam ser perfeitamente usadas em produtos de panificação. Além disso, tinham a vantagem de apresentar uniformidade no tamanho, peso e qualidade. Foram desenvolvidos produtos similares utilizando purês de cereja em um sistema de gelificação de alginato, comercializados com o nome de “bolas moldadas de cereja”. Outros produtos tipo imitação encontrados comercialmente são: imitação de fatias de pimentão para recheios de azeitonas, imitação de anéis de cebola, imitações de caviar, carne, pescados, produtos marinhos, etc. (*apud* GLICKSMAN, 1987).

***Tabela 1. Aplicações dos alginatos em alimentos***

Finalidade	Produto	Efeito
Retenção de água	Alimentos congelados	Mantém a estrutura durante o ciclo congelar-degelar.
	Recheios pastosos	Incorpora o produto, amacia e suaviza a textura.
	Coberturas	Controla a consistência do fluido.
	Pudins de padaria	Previne rachaduras e aderência do produto na embalagem
	Misturas em pó	Absorve a água ou leite rapidamente.
	Merengues	Estabiliza a massa.
	Sobremesas congeladas	Protege contra o choque térmico.
Gelificante	Pudins instantâneos	Permite uma textura firme e melhora a liberação do sabor.
	Pudins cozidos	Estabiliza o sistema do pudim, firma o corpo e reduz a perda de líquido.
	Recheios de torta	Produz um gel macio e resistente a uma larga faixa de temperatura, aumenta a liberação do sabor.
	Sobremesas em geral	Produz géis claros, firmes e de rápido preparo com água quente ou fria.
	Alimentos industrializados	Gelifica rapidamente sob uma vasta faixa de condições.
Emulsificante	Temperos para salada	Emulsifica e estabiliza.
	Molhos para carne	Emulsifica óleos e suspende sólido.

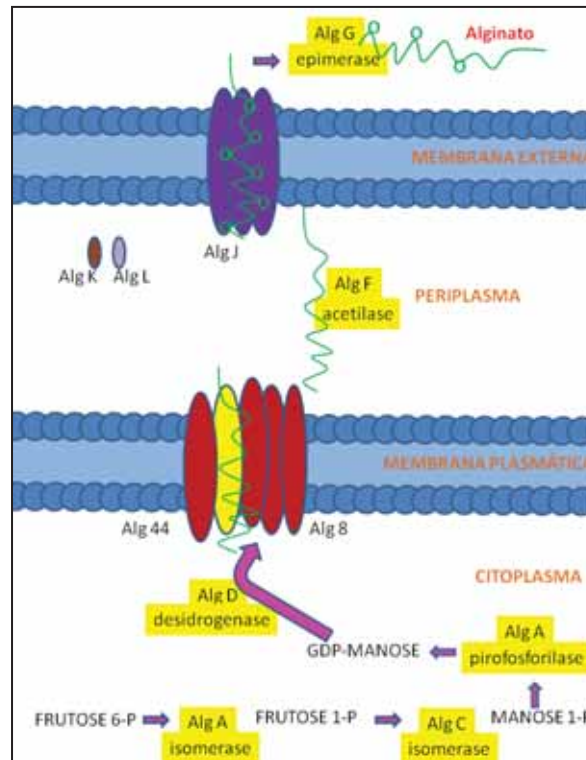
*Continuação da Tabela 2. Aplicações dos alginatos em alimentos*

Finalidade	Produto	Efeito
Estabilizante	Cerveja	Estabiliza a espuma da cerveja.
	Suco de fruta	Estabiliza a polpa de sucos concentrados ou prontos para beber.
	<i>Milk shakes</i>	Promove a maciez e a cremosidade.

### 3.2.4. Biossíntese do alginato

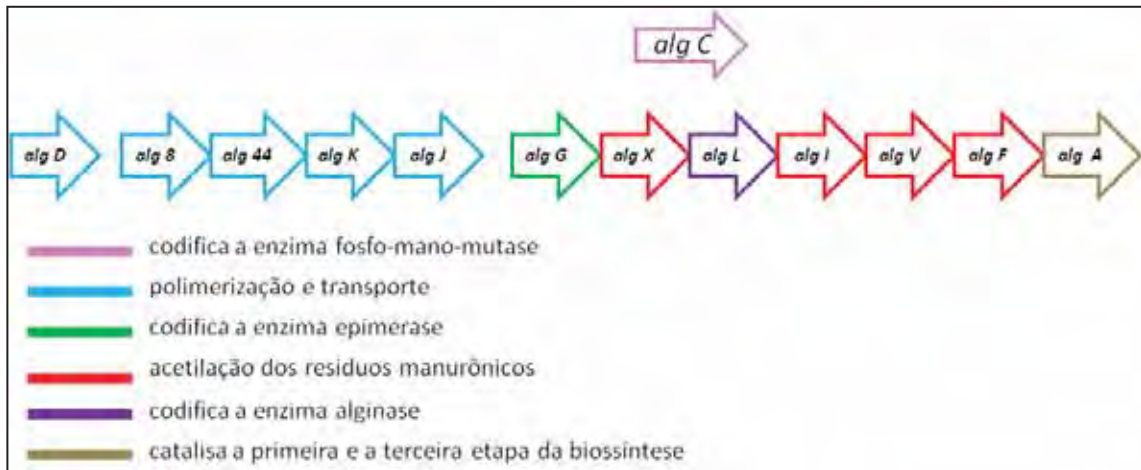
O alginato apresenta um papel biológico essencial na *Azotobacter vinelandii*, pois quando a célula vegetativa torna-se cistos maduros as camadas de exina e de intina apresentam 32 e 13% do peso seco em alginato, respectivamente. As variedades mutantes desta bactéria não produzem alginato e são incapazes de formar cistos maduros. O acúmulo de alginato extracelular age como uma barreira na difusão de oxigênio ou de metais pesados ou como proteção contra outras agressões ambientais (SEGURA; CRUZ; ESPIN, 2003).

Na bactéria *A. vinelandii* o alginato é sintetizado a partir de frutose-6-P, que é convertida pela fosfo-manose-isomerase (PMI) em manose-6-P; esta, por sua vez, torna-se manose-1-P pela ação da enzima fosfo-mano-mutase (PMM). O próximo passo é a ativação da manose-1-P pela GDP-manose-pirofosforilase (GPMP) resultando na formação do GDP-manose, que é oxidado a ácido GDP-manurônico pela enzima GDP-manose-desidrogenase (GMD). O ácido GDP-manurônico é o substrato que se polimeriza na membrana interna para formar ácido polimanurônico. No periplasma alguns dos resíduos manurônicos do ácido polimanurônico são acetilados pela acetilase. O polímero é excretado para o exterior da célula onde alguns resíduos manurônicos não acetilados são epimerizados a resíduos gulurônicos por múltiplas epimerases extracelulares resultando no alginato (Figura 3).



**Figura 3.** Rota simplificada da biossíntese de alginato pela *Azotobacter vinelandii*. Adaptado de Trujillo-Roldan e colaboradores (2003).

Os genes que codificam as enzimas envolvidas na síntese, modificação e excreção de alginato, foram identificados na *A. vinelandii*. Todos os genes estruturais estão agrupados no cromossomo e são transcritos a partir de vários promotores, exceto o gene *algC* que codifica a enzima fosfo-mano-mutase. O gene *algD*, que codifica a GDP-manose desidrogenase (DMA) é transcrito a partir de três promotores. Os genes *alg8*, *alg44*, *algK* e *algJ* que se localizam abaixo do *algD* estão organizados em uma unidade de transcrição e seus produtos participam da polimerização e excreção do alginato, o produto do *alg8* é uma glicosil transferase, a qual tem sido proposta como responsável pela atividade da polimerase; o *alg44* codifica uma outra proteína da membrana interna, a qual é responsável por uma parte do complexo de polimerização e também transporta o polímero ao periplasma; o *algJ* codifica uma proteína da membrana externa e apresenta atividade no canal iônico que é essencial para a excreção do alginato e o produto do gene *algK* é uma proteína periplásmica que pode participar na incorporação do AlgJ na membrana externa. O gene *algG* codifica uma epimerase e o *algL* a enzima alginase. Os genes *algX*, *algV*, *algI* e *algF* são responsáveis pela acetilação dos resíduos manurônicos no periplasma e como produto do gene *algA* forma-se a enzima bifuncional que catalisa a primeira e terceira etapa da biossíntese (Figura 4) (GAONA et al., 2004; STEIGEDAL et al., 2008).



**Figura 4.** Genes envolvidos na biossíntese de alginato pela *Azotobacter vinelandii*.

### 3.2.5. Produção de alginato bacteriano

Horan, Jarman e Dawes (1983) notaram que quando um mutante de *Azotobacter vinelandii* era cultivado em cultura contínua, a quantidade de polissacarídeo produzida dependia da concentração de oxigênio dissolvido e também da fonte de carbono: sacarose suportava a síntese de alginato em meio com limitação de fosfato, enquanto que o sorbitol não suportava. Mudanças na atividade específica de enzimas-chave na biossíntese de alginato (fosfomanose isomerase e GDP-manose pirofosforilase), medidas em extratos de células desenvolvidas dentro de uma faixa de valores de concentração de oxigênio dissolvido eram refletidas pelas mudanças observadas na produção de alginato, enquanto que a atividade de GDP-manose desidrogenase permanecia inalterada. Uma correlação similar entre as atividades específicas destas enzimas e a taxa de produção de alginato foi observada neste estudo durante a transição de sorbitol para sacarose como única fonte de carbono, mas a atividade da GDP-manose desidrogenase também aumentou com o aumento da produção de alginato. Após o prolongado cultivo contínuo em sacarose a mutante perdeu a habilidade de produzir alginato. As enzimas-chave na biossíntese de alginato não foram detectadas em extratos desta cepa não produtora de alginato, a qual também havia perdido a habilidade de formar cisto. Estes resultados enfatizam que a formação de alginato é controlada pela indução de enzimas-chave na biossíntese de alginato, bem como que o alginato tem um importante papel na formação de cistos pelas bactérias (HORAN; JARMAN; DAWES, 1983).

Alguns fatores que influenciam na produção de ácido algínico por *Azotobacter vinelandii* foram investigados, em cultura por batelada, por Brivonese e Sutherland (1989). Foi observado que as maiores produções de alginato (6,0 – 7,5 mg mL<sup>-1</sup> sobrenadante) ocorreram em meio rico em nitrogênio e fosfato, tendo a glicose como fonte de carbono,

aerando-se o meio com agitação a 280 rpm. A importância do oxigênio ficou evidente quando, a 120 rpm, a produção de alginato caiu para  $1,4 \text{ mg mL}^{-1}$ . A 120 rpm o acúmulo intracelular de ácido poli-hidroxibutírico (um polímero cujo acúmulo intracelular é associado com a limitação de oxigênio) foi de 40% contra 30% a 280 rpm. A presença de fosfato inorgânico foi considerada importante, pois o crescimento em meios com baixo teor de sais resultou em produção pobre de alginato, a qual não foi melhorada pela adição de fontes de nitrogênio, como o nitrato e o glutamato. A substituição da glicose por sacarose também reduziu a produção de alginato.

Em estudo semelhante, Savalgi e Savalgi (1992) verificaram que as maiores quantidades de ácido algínico produzidas por *Azotobacter vinelandii* NCIB 9068 (5,5 – 6,2  $\text{mg mL}^{-1}$  sobrenadante), em frascos agitados, foram obtidas quando o crescimento foi conduzido em um meio rico em nitrogênio com limitação de fosfato, tendo a sacarose como fonte de carbono, sob agitação a 240 rpm. Também observaram a redução na produção de alginato para  $1,6 \text{ mg mL}^{-1}$ , com a diminuição da agitação (140 rpm). Em contraste com Brivonese e Sutherland (1989), a substituição da sacarose por glicose reduziu o crescimento bem como a produção de alginato.

Os autores Peña, Campos e Galindo (1997) obtiveram uma maior concentração de alginato sob baixas condições de aeração (frascos Erlenmeyers convencionais). Este fenômeno pode estar relacionado com a sensibilidade ao oxigênio apresentada por algumas enzimas envolvidas na biossíntese do alginato por *A. vinelandii*. Os resultados estão de acordo com aqueles observados por Chen e colaboradores (1985), que indicaram que a concentração de alginato era maior a 170 rpm (para valores de rpm entre 110 e 200) para uma cultura de *A. vinelandii* conduzida em frascos agitados. Um aumento da velocidade de agitação (i.e. maior aeração) era desfavorável para a produção de alginato.

A viscosidade do caldo de cultura foi maior quando sob menor aeração, sugerindo um efeito importante do oxigênio nas características moleculares (i.e. massa molecular) do polímero. Sabe-se que a viscosidade de soluções de alginato foi bastante influenciada pela distribuição da massa molecular, mas não tanto, pelo conteúdo e distribuição dos dois monômeros da molécula de alginato (MARTINSEN et al., 1991). Entretanto, não há dados anteriores publicados sobre a viscosidade do caldo de cultura sob diferentes condições de cultivo. Peña, Campos e Galindo (1997) observaram que o grau de acetilação do alginato produzido por *A. vinelandii* era independente das condições de aeração.

Clementi e colaboradores (1995) observaram que a taxa de síntese de alginato cai rapidamente a zero como resultado de uma queda drástica no pH numa cultura de *A.*

*vinelandii*. Entretanto, no estudo de Peña, Campos e Galindo (1997), a taxa de formação de alginato não foi afetada pela queda de pH experimentada na fase estacionária de crescimento.

No trabalho de mestrado desenvolvido por Silva (2009) foram avaliadas três fontes de carbono: a sacarose, a glicose e o melaço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações e parâmetros de fermentação. Notou-se que a produtividade do alginato foi mais expressiva ( $6000 \text{ mg g de célula}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) quando utilizou-se a glicose como fonte de carbono no tempo de incubação de aproximadamente 10 h, na temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  e na concentração de glicose entre  $70 - 72 \text{ g L}^{-1}$ . Seguida da sacarose, com maior produtividade ( $1600 \text{ mg g de célula}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) no tempo de incubação de aproximadamente 18 h, entre  $60 - 62^{\circ}\text{C}$  e na concentração de  $10 \text{ g L}^{-1}$ . E por último, o melaço de cana-de-açúcar ( $250 \text{ mg g de célula}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) no tempo de incubação de 10 h, a  $60^{\circ}\text{C}$  e na concentração de sólidos solúveis entre  $4 - 6\%$ .

### 3.3. PLÁSTICOS








O crescimento da população humana levou à acumulação de enormes quantidades de resíduos de materiais não-degradáveis em todo o nosso planeta. A acumulação de materiais plásticos tornou-se uma grande preocupação em termos de meio ambiente. Os plásticos convencionais, de origem petroquímica, demoram décadas para serem decompostos na natureza e, além disso, produzem toxinas durante o processo de degradação. Por esse motivo, há um interesse especial na produção de plásticos a partir de matérias que podem ser facilmente eliminados do nosso ambiente (SURIYAMONGKOL et al., 2007; FRANCHETTI; MARCONATO, 2006).

O mundo consome atualmente cerca de 140 milhões de toneladas de plástico por ano. A produção destes materiais plásticos utiliza cerca de 150 milhões de toneladas de combustíveis fósseis. Os plásticos, espumas, revestimento e adesivos apresentam as suas propriedades físicas e químicas devido à longa cadeia carbono-carbono. Os plásticos mais utilizados na vida diária, desde 1940, têm sido o polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), poli(tereftalato de etileno) (PET) e o poli(cloreto de vinila) (PVC) (Tabela 2). O desafio para o mundo é substituir as fontes não-renováveis destes materiais com longas cadeias de carbono por uma fonte renovável (SURIYAMONGKOL et al., 2007; FRANCHETTI; MARCONATO, 2006).

Os plásticos, quando incinerados ou queimados, emitem várias substâncias tóxicas, incluindo cancerígenas tais como as dioxinas. A reciclagem de plásticos em grande escala apresenta diversos obstáculos tais como: a grande diversidade de plásticos criando uma

dificuldade na separação dos mesmos, sistemas de coleta seletiva de lixo ineficiente, além de falta de incentivos fiscais aos empresários deste setor. Além disso, alguns plásticos não podem ser reciclados para a sua utilização original.

**Tabela 3.** Apresentação de diversos tipos de plástico (siglas à esquerda, de origem inglesa)

Símbolo	Plástico
 PETE	<b>Tereftalato de polietileno (TPE)</b> - Plástico transparente, usado em garrafas, frascos. O tereftalato de polietileno é utilizado em 25% das garrafas de plástico produzidas. Pode ser reciclado em fibra de vidro utilizadas em roupas de inverno, pranchas de surf, etc.
 HDPE	<b>Polietileno de alta densidade (PEAD)</b> - Utilizado na manufatura de recipientes para detergentes, leite, garrafas de óleo, sacos e outros recipientes. O polietileno de alta densidade é usado em mais de 50 % das garrafas produzidas. Podem ser reciclados em garrafas de detergente, canos de drenagem, contentores de reciclagem, mesas, caixas de correio e cercas.
 V	<b>Vinil (V) ou Cloreto de polivinila (PVC)</b> - Plásticos especialmente resistentes; as formas rígidas de PVC são utilizadas em canos e a forma flexível é empregada em tecidos de vinil. Podem ser reciclados em cercas, canos, etc.
 LPPE	<b>Polietileno de baixa densidade (PEBD)</b> - Plástico utilizado habitualmente na produção de celofane. Também utilizado na produção de sacos para pão, lixo, etc. Pode ser reciclado e acima de tudo reutilizado em sacos de lixo e sacolas de compras.
 PP	<b>Polipropileno (PP)</b> - Plástico bastante leve usado habitualmente no empacotamento de comida (margarina, iogurte, etc.), revestimentos entre diversos usos possíveis. Podem ser reciclados e reutilizados em alimentadores de aves e baldes de água.
 OS	<b>Poliestireno (PE)</b> - Polímero conhecido como Estirofoam, sendo bastante utilizado em embalagens, como isolante em frigoríficos, copo de café, utensílios de plástico, etc. Pode ser reciclado em interruptores, termômetros, etc.
	Outros- Plásticos diferentes dos outros 6 ou mistura dos anteriores. A mistura de diferentes plásticos pode ser reciclada num plástico relativamente duro, utilizado em equipamento de exteriores, tais como mesas, cadeiras e material náutico.



O interesse pelo bioplástico encontra-se em expansão no mundo todo. Apesar disto, o alto custo de sua produção ainda é uma grande desvantagem em relação aos polímeros convencionais, basta comparar o custo de produção do poli-hidroxibutirato (PHB) estimado a US\$ 2,65/kg para uma planta de 100.000 t/ano, utilizando sacarose como substrato, com o valor do polipropileno US\$1,00/kg. Outras estimativas preliminares apresentam um custo de produção de US\$5,85/kg para uma planta de 30.000t/ano. O custo dos poli-hidroxialcanoatos (PHAs) utilizando a *Alcaligenes eutrophus* é de US\$16/kg, isto é 18 vezes mais que o polipropileno. Com a *E. coli* o preço pode ser reduzido a US\$4/kg, um custo semelhante a materiais plásticos biodegradáveis, tais como o poli-lactato (PLA) e a poli-caprolactona (PCL). A produção de PHB demanda 3 kg de sacarose/kg final de produto, sendo que o preço do açúcar representa 29% do custo final (sem considerar taxas), portanto, o custo médio de produção do PHB varia em função do tipo de açúcar empregado, do preço do açúcar, do microrganismo utilizado e da planta de produção (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006).

### 3.3.1. Plásticos convencionais

O petróleo é um recurso mineral formado por uma grande mistura de compostos. A partir do seu refino são extraídos diversos produtos como gasolina, diesel, querosene, gás de cozinha, óleo combustível, lubrificantes, parafina e compostos químicos que são matérias-primas para as indústrias de tintas, ceras, vernizes, resinas, extração de óleos e gorduras vegetais, pneus, borrachas, fósforos, chicletes, filmes fotográficos e fertilizantes.

O plástico é um material cada vez mais dominante em nossa sociedade e o encontramos frequentemente em nosso dia-a-dia. Entretanto, a sua decomposição por microrganismos é um processo lento, podendo se estender por centenas de anos.

### 3.3.2. Bioplásticos ou plásticos biodegradáveis

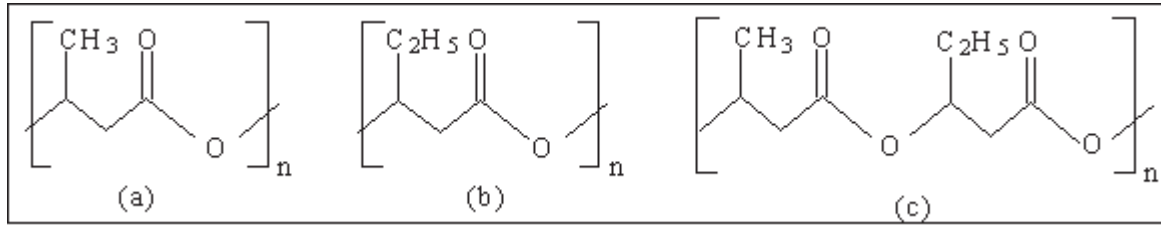
Os plásticos biodegradáveis são degradados por microrganismos quando descartados em solo e aterros. Essa degradação resulta da ação de microrganismos, tais como fungos, bactérias e algas de ocorrência natural, gerando CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, componentes celulares e outros produtos, segundo estabelecido pela American Standard for Testing and Methods (ASTM-D-833). De outro modo, os plásticos biodegradáveis são materiais que se degradam em dióxido de carbono, água e biomassa, como resultado da ação de organismos vivos ou enzimas

(FRANCHETTI; MARCONATO, 2006; SURIYAMONGKOL et al., 2007; VAN-THUOC et al., 2008; TOKIWA et al., 2009).

Os PHAs são polímeros intracelulares que podem ser sintetizados por muitas bactérias em biorreatores a partir de açúcares em condições de crescimento caracterizadas por excesso de uma fonte de carbono e limitação de outros nutrientes como nitrogênio e fósforo (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006; ALBUQUERQUE et al., 2007; SUZUKI et al., 2008). Embora muitos microrganismos tenham a capacidade de acumular este polímero, um número limitado é considerado como bons candidatos à produção industrial de PHB. Entre eles, *Cupriavidus necator* (anteriormente chamado *Ralstonia eutropha*), *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* e a recombinante *Escherichia coli* têm demonstrado os mais elevados acúmulos de poliéster (cerca de 70-90% da massa celular seca). O microrganismo *Cupriavidus necator* requer limitação de nutrientes durante a fermentação para, então, produzir PHB. Este microrganismo acumula mais PHB durante a fase estacionária de crescimento. As outras três bactérias não requerem limitação de nutrientes para iniciar a síntese de PHB, apesar da limitação de um nutriente no meio de cultura favorecer um maior acúmulo deste polímero no interior das células. Em alguns desses casos, essas fontes complexas de nitrogênio como extrato de levedura ou peptona de peixe podem ser utilizadas para reforçar o crescimento da célula e, por sua vez, a produtividade volumétrica (QUILLAGUAMÁN et al., 2008).

Estudos realizados anteriormente mostraram que enterobactérias não acumulavam PHAs naturalmente, sendo necessária a introdução de genes clonados. Entretanto, Lugg e colaboradores (2008) estudaram uma enterobactéria de ocorrência natural, a *Serratia* sp., e observaram que esta era capaz de acumular PHB (aproximadamente 50% do peso celular seco) em meio contendo excesso de uma fonte de carbono e deficiência em nitrogênio.

Existe uma grande diversidade estrutural dos PHAs, sendo que pelo menos 90 monômeros diferentes foram identificados como constituintes de sua estrutura molecular. Estes monômeros incluem: quase todos os 3-hidroxicanoatos (3HAs) contendo de 3 a 16 átomos de carbono; 3-hidroxicenoatos contendo uma ou duas insaturações; 3HAs com grupos metila em várias posições; outros hidroxicanoatos com os grupos hidroxila nas posições 4, 5 ou 6; 3HAs contendo carboxi livres, carboxi esterificados a alquilas ou ácido benzóico, fenoxi ou acetoxi, para-cianofenoxi ou para-nitrofenoxi, hidroxilas secundárias, epoxi, ciano ou átomos como flúor, cloro ou bromo ligados ao carbono terminal do monômero (GOMEZ; BUENO-NETTO, 2001; MISRA et al., 2007) (Figura 5).



**Figura 5.** Estrutura química dos poli-hidroxicanoatos (PHAs): a) poli-hidroxi-butilato; b) poli-hidroxi-valerato e, c) poli-hidroxi-butilato-co-valerato.

A síntese e incorporação desses diferentes monômeros dependem do fornecimento de um substrato adequado que possa ser convertido no hidroxialcil-CoA desejado por meio de reações metabólicas existentes na célula bacteriana. Além disso, é necessário que a célula bacteriana contenha uma enzima denominada PHA sintase, que seja capaz de incorporar a hidroxialcil-CoA sintetizada a uma cadeia polimérica (GOMEZ; BUENO-NETTO, 2001).

### 3.4. POLI-HIDROXIALCANOATOS

A presença de inclusões no citoplasma, parecidas com inclusões de lipídeos, as quais são solúveis em clorofórmio foram inicialmente observadas na *Azotobacter chroococcum* por volta de 1900. A composição química de inclusões similares encontradas na bactéria *Bacillus megaterium* foi identificada em 1926, como o ácido poli-3-hidroxi-butírico (P(3HB)), por Lemoigne. No final dos anos 50, estudos realizados com o gênero *Bacillus* sugeriram que o P(3HB) apresentava a função de reserva intracelular de carbono e energia para esta bactéria. Em 1974, Wallen e Rohwedder identificaram outros hidroxicanoatos além do 3HB, extraídos do lodo ativado. Um interessante trabalho também foi realizado por Witholt e colaboradores, em 1983, quando cultivaram *Pseudomonas oleovorans* em n-octano. Uma análise elementar do polímero intracelular mostrou que esta bactéria acumulou principalmente 3-hidroxi-octanoato e pequenas quantidades de 3-hidroxi-exanoato (*apud* SUDESH; ABE; DOI, 2000, p.: 1504).

O copolímero P(3HB-co-3HV) foi produzido comercialmente pela empresa ZENECA Bioproducts, na Inglaterra, a partir de glicose e ácido propiônico, empregando-se uma linhagem mutante de *Ralstonia eutropha*. O poliéster obtido deste processo foi lançado no mercado, com o nome de BIOPOL (BYROM, 1992). O BIOPOL é utilizado desde 1990 na Alemanha na produção de frascos de xampu para a indústria de cosméticos Wella (BRAUNEGG; LEFEBVRE; GENSER, 1998). Outros produtos como aparelhos de barbear descartáveis, também feitos de BIOPOL, foram testados no Japão. Copos feitos de PHA puro

ou de papel revestido internamente com um filme de BIOPOL, como impermeabilizante, já foram usados. As misturas de PHAs com plásticos convencionais, como polipropileno, também foram testadas e atualmente a empresa Monsanto (USA) possui o direito de patente deste produto (BYROM, 1992).

### **3.4.1. Características dos poli-hidroxicanoatos**

O PHB possui propriedades similares ao polipropileno com três características únicas: processabilidade termoplástica, 100% de resistência à água e 100% de biodegradabilidade (HRABAK, 1992). Booma, Selke e Giacín (1994) estabeleceram que o PHB é um homopolímero alifático com ponto de fusão a 179°C e altamente cristalino (80%). O peso molecular do PHB decresce aproximadamente pela metade do valor original quando este é mantido a 190°C por 1 hora. Os PHAs possuem propriedades físicas que vão desde quebradiços e termicamente instáveis até macios e resistentes, dependendo de sua composição. As propriedades físicas do PHB, por exemplo, cristalização e alta força de tensão dependem do peso molecular, o qual é influenciado pela espécie de microrganismo empregada, condições de crescimento e pureza das amostras obtidas (PUNRATTANASIN, 2001; HEO et al., 2008).

### **3.4.2. Aplicações dos poli-hidroxicanoatos**

#### **3.4.2.1. Aplicações médicas e farmacêuticas**

Uma norma internacional ISO 10993-3 (1982) estabelece os requisitos específicos para a biocompatibilidade, incluindo os testes com base na natureza do contato e do tempo de permanência do biomaterial implantado. A norma determina que todos os materiais que permanecerão em contato com mucosas, ossos ou tecidos dentários, na qual o contato exceder 30 dias, assim como todos os dispositivos implantáveis em que o contato ultrapasse 24 h, devem ser submetidos a testes de genotoxicidade. Baseado nas recomendações padrões das normas ISO 10993-3 (1982) e a ASTM (1987), muitos métodos de ensaio são realizados para a determinação de atividades mutagênicas e genotóxicas do implante. Estes incluem testes de toxicidade, mutagênese, aberrações cromossômicas, etc. (ALI et al., 2008).

Embora o produto de degradação do P(3HB), o D(-)-3-ácido hidroxibutírico seja um composto metabólico intermediário de muitos organismos (LAFFERTY; KORSATKO; KORSATKO, 1988; LEE, 1996), Ali e colaboradores (2008) realizaram o estudo de mutagenicidade do poli-hidroxibutirato utilizando o teste *Salmonella*/microsomo e verificaram que o PHB não é genotóxico e não altera expressão do proto-oncogenes e do gene anti-apoptótico considerados no estudo. Desse modo, é plausível que haja biocompatibilidade do tecido animal com o P(3HB), podendo assim ser implantado em seus tecidos sem alguma toxicidade.

Algumas possíveis aplicações de PHAs incluem: carregadores biodegradáveis que apresentam a função de liberarem fármacos por um determinado tempo dentro do corpo do indivíduo, agulhas cirúrgicas, fios de suturas, reposição do tecido ósseo, etc. A vantagem do uso de plásticos biodegradáveis é que não necessitam de remoção cirúrgica (PUNRATTANASIN, 2001).

Outra vantagem em utilizar o PHB em sistemas de administração de medicamentos é que a concentração do fármaco no sangue do doente e/ou tecidos pode ser mantida em um nível desejado por um longo tempo. O requisito principal para a fabricação de medicamentos com um sistema de liberação e ação prolongada é a disponibilidade de um material capsular adequado, que deve ser absolutamente inócuo para o organismo e de possuir as propriedades físico-mecânicas e biomédicas necessárias, incluindo sua degradação no meio biológico. Ao contrário de outros materiais que são amplamente utilizados em administração controlada de medicamentos, tais como a gelatina, proteínas, etc., os PHAs estão disponíveis na forma quimicamente pura e sua velocidade de degradação no meio é baixa quando comparada com os compostos citados acima, fato que é muito importante em tratamentos prolongados. Através da variação da estrutura química do PHAs ou de sua mistura com diferentes materiais, pode-se controlar a porosidade e a velocidade de degradação da matriz polimérica e, conseqüentemente, a taxa de liberação do fármaco. Atualmente, os carregadores biodegradáveis são utilizados para transportarem antidepressivos, contraceptivos, antineoplásicos e antiinflamatórios (SHISHATSKAYA et al., 2008; SUZUKI et al., 2008).

#### **3.4.2.2. Aplicações na agricultura**

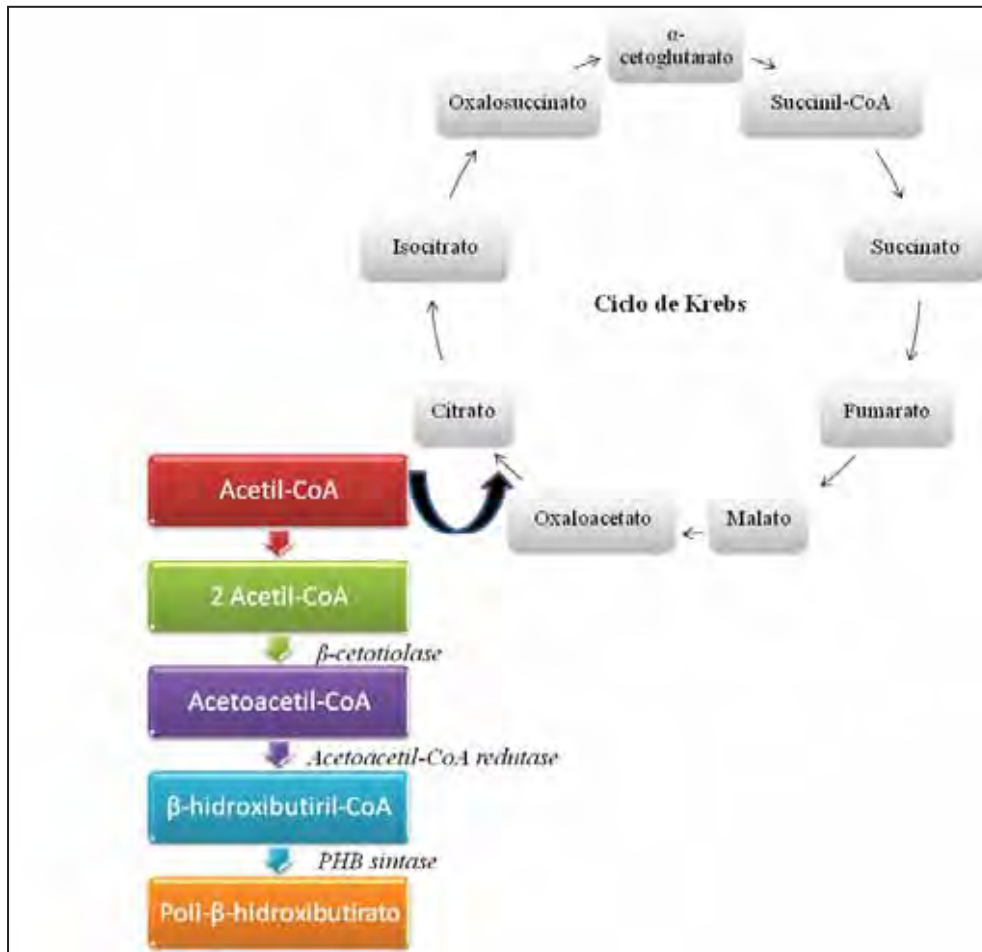
Os PHAs são biodegradáveis no solo e podem ser utilizados como carregadores para liberarem inseticidas, herbicidas ou fertilizantes por um determinado tempo no solo; como containeres e embalagens; como matriz biodegradável para liberação de fármacos na medicina veterinária; etc. (ARAÚJO, 2005).

### **3.4.2.3. Aplicações em produtos de uso geral**

As possíveis aplicações dos PHAs incluem filmes plásticos, sacolas, containeres, barbeadores, utensílios domésticos e uma variedade de produtos encontrados em nosso cotidiano (ARAÚJO, 2005).

### **3.4.3. Biossíntese do poli-hidroxibutirato**

A produção do PHB na bactéria *A. vinelandii* envolve três enzimas. No início do processo ocorre a condensação de duas moléculas de acetil-CoA pela enzima  $\beta$ -cetotiolase para gerar acetoacetil-CoA, a qual é reduzida pela acetoacetil-CoA redutase utilizando NADPH produzindo D(-)- $\beta$ -hidroxibutiril-CoA, que é finalmente polimerizada pela PHB sintase resultando no PHB (SEGURA; CRUZ; ESPIN, 2003) (Figura 6).



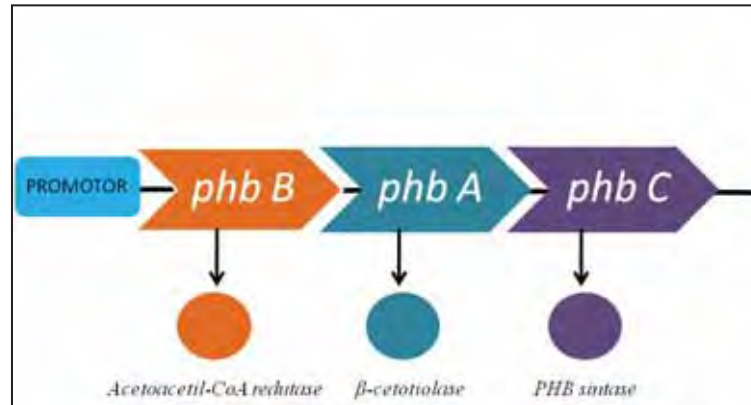
**Figura 6.** Biossíntese do PHB e ciclo de Krebs na bactéria *Azotobacter vinelandii*.

Em geral, as bactérias produtoras de PHB apresentam o acúmulo deste polímero em resposta a uma interferência em seu crescimento, principalmente devido à falta de nutrientes como nitrogênio, fósforo, magnésio e oxigênio, e na presença de excesso de uma fonte de carbono (BURNS et al., 2007).

O ponto de controle importante é a atividade da enzima  $\beta$ -cetotiolase. Esta enzima é ativada quando a concentração de acetil-CoA é elevada, uma situação que resulta do acúmulo de NADH ou NADPH em resposta a baixa concentração de oxigênio no meio. Com estes metabólitos ocorre a inibição das enzimas (citrato sintase e isocitrato desidrogenase) do ciclo de Krebs reduzindo o fluxo de carbono para este ciclo e levando a um aumento da concentração de acetil-CoA, fato que estimula a atividade da  $\beta$ -cetotiolase. Estas condições também favorecem a atividade da enzima (acetoacetil-CoA redutase) que catalisa a segunda etapa do processo (PAGE; MANCHAK; RUDY, 1992).

Muitos pesquisadores têm identificado os genes estruturais responsáveis pela síntese de PHB na *A. vinelandii*. Observou-se que o gene *phbA* codifica a  $\beta$ -cetotiolase e os genes

phbB e phbC codificam a segunda e terceira enzima, respectivamente, da etapa de biossíntese do PHB (SEGURA; CRUZ; ESPIN, 2003) (Figura 7).



**Figura 7.** Genes envolvidos na biossíntese de PHB pela *Azotobacter vinelandii*.

Durante o ciclo de vida da bactéria *A. vinelandii* pode ocorrer a formação de cistos resistentes à dessecação após crescimento exponencial, embora essas condições sejam observadas em menos de 0,1% da população celular. A formação de cistos também pode ser induzida por reagentes específicos como n-butanol ou  $\beta$ -hidroxibutirato (LIN; SADOFF, 1968).

As células vegetativas móveis, em grande tamanho e com forma oval, quando transferidas para um meio sólido, sem nitrogênio e com 0,2% de  $\beta$ -hidroxibutirato formam cistos. No trabalho apresentado por Segura, Cruz e Espin (2003), foi relatado que quatro horas após a incubação neste meio, essas células perderam os seus flagelos e sofreram uma última divisão celular dando origem à duas células completamente redondas e muito encapsuladas, cujo recobrimento era formado pelo exopolissacarídeo alginato. Após 30 horas formou-se a exina (camada exterior) em torno do cisto maduro. Posteriormente, ocorreu a formação da intina (estrutura que se localiza no espaço entre a exina e membrana celular externa). O ponto chave destes eventos foi a formação de um cisto maduro, consistindo de uma célula pequena e redonda, além de uma parede celular delgada de ácido murâmico. O centro celular estava coberto com duas camadas, a exina e a intina, compostas principalmente de lipoproteínas e alginato e, no centro da célula existiam muitos grânulos de PHB (SEGURA; CRUZ; ESPIN, 2003).

Os cistos são células metabolicamente inativas sendo consideravelmente mais resistentes às condições adversas ou deletérias quando comparados as células vegetativas. No laboratório são viáveis por mais de 10 anos, quando mantidas em solo seco, sugerindo que a resistência à dessecação lhes permita sobreviver em tais condições, em natureza.



A etapa de germinação ocorre quando os cistos metabolicamente inativos sofrem as alterações necessárias para se tornarem células vegetativas. Isso ocorre quando os cistos são incubados em meio contendo sais minerais, sem nitrogênio, em condições aeróbicas e na presença de uma fonte de carbono como glicose ou sacarose (SEGURA; CRUZ; ESPIN, 2003).

#### **3.4.4. Produção de poli-hidroxialcanoatos**

A produção de PHA utilizando bactérias envolve as seguintes etapas: manutenção da cultura bacteriana em meio apropriado; preparo do inóculo e/ou fermentação. Durante o preparo do inóculo e fermentação, o microrganismo é cultivado em meio contendo sais minerais e uma ou mais fontes de carbono. As fontes de carbono podem ser refinadas como o açúcar sacarose e glicose ou fontes mais complexas como melão de beterraba, melão de cana-de-açúcar, soro de queijo, resíduos agroindustriais, etc. (PAGE e KNOSP, 1989).

No trabalho de mestrado de Silva (2009) foram testadas como fonte de carbono a sacarose, a glicose e o melão de cana-de-açúcar. Os estudos mostraram que a maior produtividade de PHB ( $100 \text{ mg g de célula}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) foi atingida utilizando o melão de cana-de-açúcar como fonte de carbono com um tempo de incubação de aproximadamente 10 h, a  $60^\circ\text{C}$  e nas concentrações de sólidos solúveis entre 14 – 25%. Seguida da glicose (produtividade de PHB igual a  $60 \text{ mg g de célula}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) no tempo de incubação de aproximadamente 10 h, entre  $23\text{-}26^\circ\text{C}$  e concentração de glicose entre 48 e  $62 \text{ g L}^{-1}$ . Por fim, a sacarose como fonte de carbono (produtividade do PHB igual a  $45 \text{ mg g de célula}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) no tempo de incubação de aproximadamente 18 h, a  $60^\circ\text{C}$  e concentração de sacarose de  $10 \text{ g L}^{-1}$ .

A Tabela 3 mostra algumas companhias que produzem PHB, mas a principal desvantagem quando comparado com o plástico de origem petroquímica é o alto custo da produção. A fonte de carbono representa a maior parte do custo total da produção (aproximadamente 45%). Desse modo, muitos estudos estão sendo conduzidos de modo a encontrar uma fonte de carbono viável economicamente e biossinteticamente para a produção de PHB (Posada et al., 2011).

**Tabela 4. Principais produtores de PHA no mundo (retirado de Posada et al., 2011)**

PHB: nome comercial	Empresa	Substrato	Preço (US\$/kg)	Produção (tonelada/ano)
Biomer	Biotechnoly Co,	Pequena escala de	25 (2003)	50 (2003)
	Alemanha	produção	3,75-6,25 (2010)	-
Biocycle	PHB Industrial S/A,	Açúcar da cana- de-	12,5-15 (2003)	1400 (2003)
	Brasil	açúcar	3,12-3,75 (2010)	30-60000 (2010)
Biogreen	Mitsubishi GAS Chemical, Japão	Metanol	2,75 (2010)	-
P(3HB)	Metabolix, EUA	Metanol	2,75 (2010)	-
	(BASF, ADM)	Açúcar do milho	-	-

### 3.4.5. Métodos de extração e determinação do PHA

A metodologia convencional é baseada na solubilidade do polímero em clorofórmio e de sua insolubilidade em metanol. Os polihidroxialcanoatos são extraídos do citoplasma celular. A membrana celular é rompida e o PHA é dissolvido e separado da biomassa residual (POSADA et al., 2011). O PHA presente no clorofórmio pode ser recuperado por evaporação do solvente e precipitação por adição de metanol, etanol, etc.. Outras metodologias foram desenvolvidas para evitar o uso de solventes orgânicos. Nestas, as células bacterianas são tratadas com um coquetel de enzimas (incluindo proteases, nucleases e lisozimas) e detergentes para remover proteínas, ácidos nucléicos e paredes celulares deixando intactos os grânulos de PHA. Entretanto, o uso destas metodologias aumentam o custo final da produção do PHA (PUNRATTANASIN, 2001; SURIYAMONGKOL et al., 2007; SUZUKI et al., 2008).

Outros métodos desenvolvidos empregam o hipoclorito de sódio para a digestão de materiais celulares presente na célula, entretanto o uso deste composto pode causar uma degradação severa na molécula de PHB resultando em até 50% da redução do seu peso molecular. Já o uso de hipoclorito de sódio com clorofórmio reduz significativamente esta degradação da molécula. Neste caso, o clorofórmio dissolve imediatamente o PHB, isolando-o do hipoclorito e protegendo-o da degradação (LEE, 1996). A Tabela 4 mostra os métodos mais utilizados para a extração de PHA.

**Tabela 5. Métodos de extração de PHA (adaptado de POSADA et al., 2011)**

Métodos de extração	Vantagens	Desvantagens	Resultados (% massa)
Extração com solvente	Eliminação de endotoxina/alta pureza. Não há degradação do polímero.	Quebra a morfologia dos grânulos de PHA. Risco a saúde devido ao emprego de solventes halogênicos.	Pureza: 99,5%; Recuperação: >90%
Digestão com surfactantes	Tratamento de alta quantidade de células. Não há degradação do PHA.	Necessidade de lavagens sucessivas com água. Degradação do PHA.	Surfactante SDS Pureza: >95%
Digestão com NaOCl	Alta pureza.	Degradação do PHA.	Pureza: 99%; Recuperação: 94%
Digestão com NaOCl e clorofórmio	Baixa degradação do PHA e alta pureza.	Alta quantidade de solvente necessária.	Pureza: >97%; Recuperação: 91%
Digestão com NaOCl e surfactantes	Degradação do PHA limitada	-	Surfactante – sal dissódio de EDTA. Pureza: 98%; Recuperação: 91%
Digestão com quelato e surfactantes	Alta pureza. Baixa poluição ambiental. Baixa degradação do PHA.	Grandes quantidades de resíduo.	Pureza: 98,7%; Recuperação: 93,3%
Seletiva dissolução da massa celular (do inglês <i>NPCM – non-PHB cell mass</i> ) com prótons	Alta recuperação e alta pureza.	-	Pureza: 98,7%, Recuperação: 95,4%
Digestão enzimática	Boa recuperação	Alto custos com enzimas.	Pureza: 92,6%; Recuperação: 90%
Homogeneização a alta pressão	Nenhum composto químico utilizado.	Baixa taxa de ruptura de células, mesmo para baixas quantidades de biomassa.	Pureza: 95%
CO <sub>2</sub> supercrítico	Baixa toxicidade.	Baixa recuperação.	Recuperação: 89%

Os métodos utilizados na determinação do poli-hidroxibutirato incluem: a cromatografia gasosa, na qual é realizada uma metanólise do ácido-poli-hidroxibutírico sem prévia extração do PHB do interior das células (BRAUNEGG; SONNLEITNER; LAFFERTY, 1978); o outro método consiste na reação do PHB com ácido sulfúrico concentrado por meio de aquecimento obtendo como produto final o ácido crotônico, cujo composto é analisado em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 235 nm (LAW; SLEPECKY, 1961).

#### 3.4.6. Biodegradação de poli-hidroxicanoatos

A vantagem do plástico biodegradável quando comparada com o plástico de origem petroquímica é que o tempo para degradá-lo dependerá do que foi adicionado à resina considerada biodegradável, mas a ordem de grandeza é de meses (6 a 12 meses) contra 40 a 50 anos ou até 200 anos no caso do PET.

O PHA apresenta como principal característica a sua biodegradabilidade, podendo ser biodegradado em diversos ambientes naturais como: solo, ambientes marinhos e em lagoas. Entretanto, a velocidade de biodegradação do material dependerá de vários fatores relativos ao ambiente como temperatura, nível de mistura, pH e nutrientes, além de fatores relacionados ao material biodegradável como composição, cristalinidade, à presença ou não de aditivos e à área superficial (SUDESH; ABE; DOI, 2000).

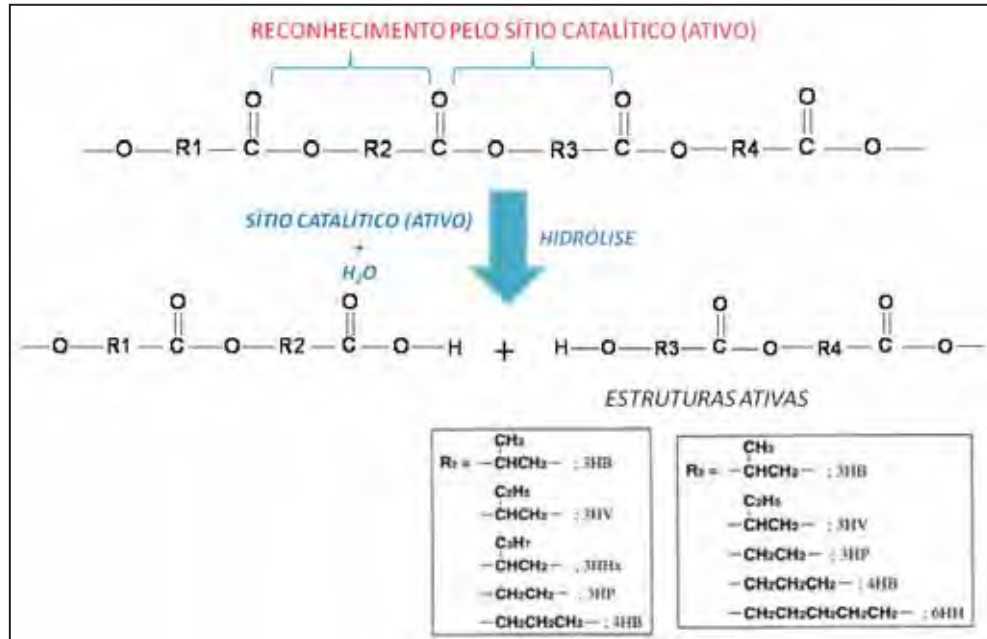
Um grande número de microrganismos como bactérias e fungos do solo, lodos, ambientes marinhos, lagoas, ar, etc., excretam enzimas PHA depolimerase que hidrolisam o PHA em oligômeros e monômeros solúveis em água, os quais são subsequentemente utilizados como nutrientes pelas células.

Tseng e colaboradores (2007) isolaram diversas linhagens de actinomicetos termófilos de diversos ambientes de Taiwan e utilizaram em ensaios para degradação de poli-etileno succinato (PES), poli-caprolactona (PCL) e / ou de poli-hidroxibutirato (PHB) por meio do teste da zona clara. Dentre as 341 estirpes de actinomicetos termófilos, 105 degradaram o PHB (30,8%), 198 eram decompositores de PCL (58,1%) e 99 degradaram o PES (29,0%). Além disso, 77 degradaram tanto o PHB e como o PCL (22,6%), 35 isolados degradaram o PHB e o PES (10,3%), 81 isolados degradaram o PES e o PCL (23,8%) e 31 degradaram os três poliésteres usados neste estudo (9,1%). Com base na morfologia e características químicas, estas 31 estirpes pertenciam aos gêneros *Actinomadura* (12,9%), *Microbispora* (25,8%), *Streptomyces* (48,4%), *Thermoactinomyces* (9,7%) e *Saccharomonospora* (3,22%).

Tokiwa e Calabia (2007) estudaram a degradação microbiana do filme de PHB utilizando a bactéria isolada do solo *Pseudomonas* cepa SC-17. As observações em microscopia eletrônica de varredura revelaram dois modos de degradação na superfície dos filmes de PHB, sendo um dos modos a degradação somente por ação da enzima e o outro pela proliferação de microrganismos sobre a superfície do filme formando buracos esféricos.

Acredita-se que a superfície do filme de PHB seja uma área ideal para o crescimento de microrganismos que degradam este composto. Normalmente, a aderência de microrganismos na superfície do material sólido ou de filmes e a posterior colonização da superfície exposta são os principais mecanismos envolvidos na degradação microbiana de polímeros sólidos.

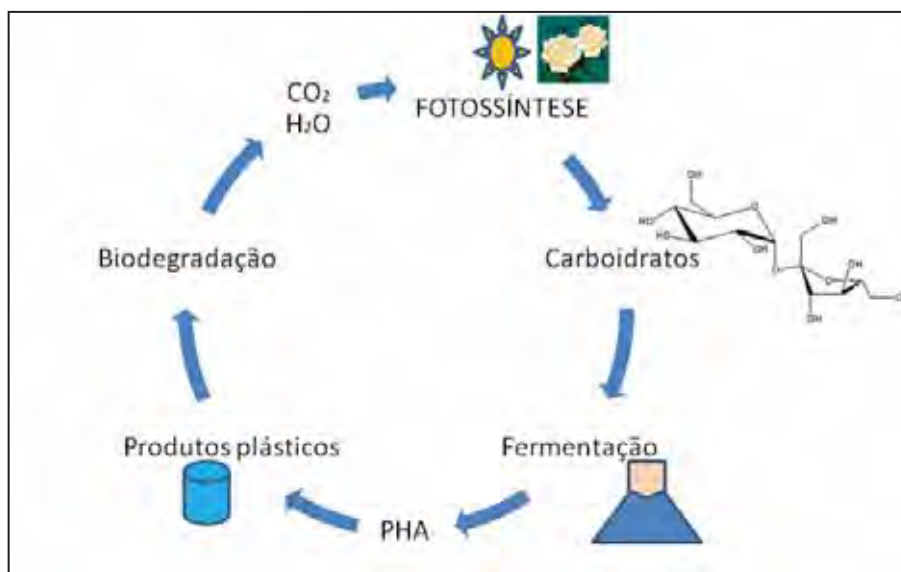
O estudo realizado por Sudesh, Abe e Doi (2000) com o auxílio da microscopia eletrônica mostrou que a degradação do PHB ocorreu na superfície do material por meio da hidrólise enzimática. A velocidade de degradação enzimática do P(3HB) pela enzima PHB depolimerase foi fortemente dependente da concentração da enzima e este processo envolveu duas etapas: a adsorção e a hidrólise. Na primeira etapa a enzima se ligou à superfície do material e na segunda etapa ocorreu a hidrólise das cadeias poliméricas por meio do sítio ativo da enzima. Foi proposto um modelo no qual o domínio catalítico principal da enzima PHB depolimerase identifica ao menos três unidades monoméricas como substrato, sendo a velocidade de hidrólise enzimática de uma ligação éster fortemente dependente da estrutura química da segunda e da terceira unidade monomérica na cadeia do poliéster. Desse modo, o sítio catalítico se liga ao substrato por interações com o grupo carbonil na unidade hidroxil terminal  $R_1$  para auxiliar a reação de hidrólise da segunda ligação éster com o sítio ativo do domínio catalítico. O comprimento da cadeia principal de carbono da segunda unidade monomérica  $R_2$  deve ser limitada entre 3 a 4 átomos de carbono devido a sua facilidade de ligação com o sítio ativo da enzima. Por outro lado, a estrutura química da terceira unidade monomérica  $R_3$  deve afetar a acessibilidade da ligação éster ao sítio ativo da enzima PHB depolimerase. Quando a terceira unidade monomérica apresenta uma cadeia lateral muito volumosa, como as unidades 3-hidroxivalerato e o 3-hidroxiexanoato, a PHB depolimerase pode apresentar dificuldade em atacar a ligação éster. Conseqüentemente, a velocidade de hidrólise da ligação éster pela PHB depolimerase decresce com o aumento do tamanho da cadeia das unidades de hidroxialcanoatos (SUDESH; ABE; DOI, 2000).



**Figura 8.** Reação de hidrólise enzimática da ligação éster por meio da enzima extracelular PHB depolimerase.

Os produtos finais da degradação do PHA em ambientes aeróbicos são dióxido de carbono e água, enquanto metano é produzido em condições anaeróbicas. O efeito de diferentes ambientes na velocidade de degradação do P(3HB) e P(3HB-co-3HV) tem sido estudado por diversos pesquisadores e foi mostrado que o P(3HB-co-3HV) (modelagem de 1 mm espessura) foi completamente degradado depois de 6 e 75 semanas em lodo anaeróbico e solo, respectivamente (LEE, 1996; TOKIWA; CALABIA, 2007).

O ciclo de carbono envolvendo os PHAs está ilustrado na Figura 9.



**Figura 9.** Ciclo de carbono dos poli-hidroxicarboxilatos.

## **3.5. PRODUÇÃO DE ALGINATO E POLI-HIDROXIBUTIRATO A PARTIR DE SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO**

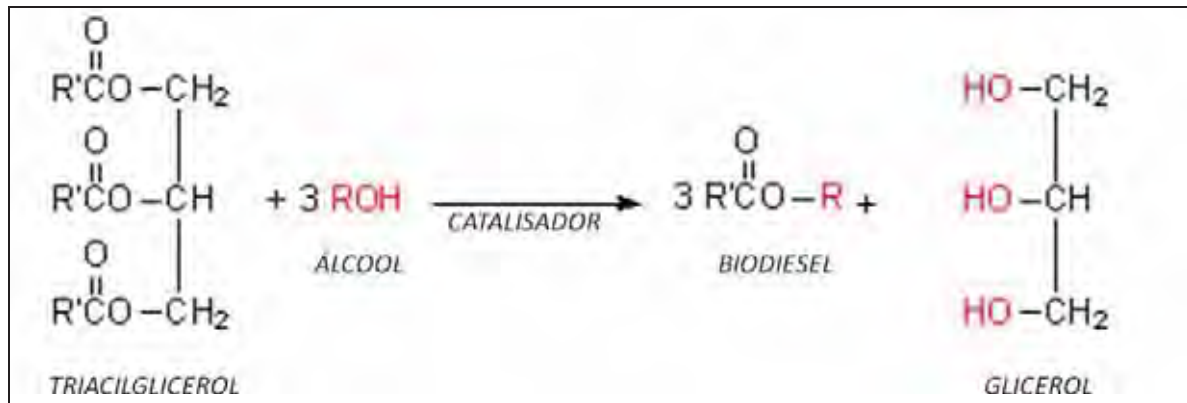
### **3.5.1. Glicerina**

Os sinônimos da glicerina são glicerol, trihidroxipropano, glicil álcool, gliceril e 1,2,3-trihidroxipropano. Este composto foi descoberto por Carl W. Scheele em 1779 durante a separação de uma mistura aquecida de PbO preparada com óleo de oliva. A glicerina na sua forma pura apresenta-se como um líquido viscoso, incolor, inodoro e higroscópico, com sabor doce, solúvel em água e álcool, insolúvel em éter e em clorofórmio (RIVALDI et al., 2007/2008).

Na natureza, a glicerina está presente em vegetais (soja, mamona, babaçu, girassol, palma, algodão, coco, dendê, pinhão manso) e animais (como formas combinadas de glicerina com ácidos graxos). A glicerina está presente no sistema metabólico de microrganismos; na qual atua como precursor de numerosos compostos e como regulador de vários mecanismos bioquímicos intracelulares. Nos eucariotos, a glicerina constitui o principal composto formado para regular as variações de atividade de água em ambientes altamente osmofílicos. Em humanos, o glicerol participa na termorregulação do corpo, resistência a altas temperaturas, na resistência dos músculos em atividades físicas e na resposta neural da variação da glicemia.

No cenário industrial a glicerina está atualmente relacionada, principalmente, com a produção de biodiesel. O biodiesel é um substituto do diesel e o consumo brasileiro deste composto, em 2003, foi de cerca de 38 bilhões de litros e, em 2005, o Brasil ainda importava cerca de 11% de óleo diesel. Atualmente cerca de 40 bilhões de litros desse combustível são usados, ocorrendo a importação de 2 bilhões de litros por ano – o equivalente a 5% do diesel consumido (SANTOS; PINTO, 2009).

O biodiesel apresenta em sua composição ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, obtidos a partir da reação de transesterificação de triglicerídeos. A transesterificação consiste na reação dos triglicerídeos presentes nos óleos vegetais ou gorduras animais com álcool em presença de catalisador (Figura 10).



**Figura 10.** Transesterificação de triacilglicerol, onde R' representam cadeias carbônicas dos ácidos graxos.

No Brasil, devido à grande diversidade de espécies oleaginosas, pode-se produzir biodiesel a partir de diferentes óleos vegetais como soja, milho, amendoim, algodão, babaçu, palma, etc. Além disso, esse biocombustível pode ser produzido a partir de óleos de frituras e de sebo bovino, reduzindo, assim, os riscos de poluição ambiental causados por esses materiais (SANTOS; PINTO, 2009).

Para cada 90 m<sup>3</sup> de biodiesel produzido pela reação de transesterificação de óleos vegetais, são gerados aproximadamente 10 m<sup>3</sup> de glicerina bruta. Apenas ocorrerá variação quanto à composição da glicerina bruta produzida, pois devido ao processo de fabricação utilizada em cada indústria o lote deste resíduo poderá apresentar uma composição diferente (SILVA, 2010).

O biodiesel é um combustível obtido de fontes limpas e renováveis que não contém compostos sulfurados (não contribui para formação de chuvas ácidas) e aromáticos; apresenta alto número de cetanos (o correspondente a octanos na gasolina), além de apresentar a característica de biodegradabilidade. Esse biocombustível, quando comparado ao diesel, oferece vantagens para o meio ambiente como a redução de emissões de dióxido de carbono e de materiais particulados.

No Brasil, de acordo com a Lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005, a qual começou a vigorar em 1º de janeiro de 2008, o óleo diesel comercializado em todo o país deve conter, obrigatoriamente, 2% de biodiesel e a previsão é que em 2013 seja obrigatória a adição de 5% ao diesel comum. Nos Estados Unidos, a produção de biodiesel aumentou de 500 mil galões em 1999 para 500 milhões de galões em 2007, fato que fez o preço da glicerina cair drasticamente. Entre 2004 e 2006, o preço da glicerina caiu dez vezes, levando as empresas Dow Chemicals e Procter & Gamble fecharem as indústrias de produção deste composto.



A glicerina derivada da produção do biodiesel possui baixo valor agregado, pois contém resíduos de metanol, hidróxido de sódio, ácidos graxos livres, sais de ácido graxo, ésteres, compostos de enxofre, proteínas e minerais. A possibilidade de purificação depende da disponibilidade de métodos viáveis e, geralmente, indústrias de pequenos e médios portes não são capazes de purificar, com baixo custo, a glicerina destinada às aplicações mais nobres, como nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos (BARBOSA, 2009). Devido a este fato, uma maior quantidade de efluentes contendo glicerol poderá ser descartada no meio ambiente sem nenhum tratamento, aumentando conseqüentemente os problemas e riscos ambientais (RIVALDI et al., 2007/2008).

A conversão microbiana de glicerol em outros compostos de alto valor agregado como biopolímeros e biomassa tem sido investigada recentemente (ITO et al., 2005). No trabalho de Freitas e colaboradores (2010), o glicerol puro foi utilizado como fonte de carbono para produção de um novo exopolissacarídeo sintetizado por *Pseudomonas oleovorans* NRRLB – 14682, cuja produtividade foi de  $0,083 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Teeka e colaboradores (2010) isolaram bactérias produtoras de poli-hidroxicanoatos, presentes no solo e em diferentes ambientes de águas contaminadas. Na pesquisa realizada, verificou-se que a produtividade de poli-hidroxicanoato em glicerol puro foi de  $3,26 \text{ mg g de célula}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para a bactéria denominada AIK7. O estudo desenvolvido por Ibrahim e Steinbüchel (2010) revelou que utilizando-se  $15 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol puro foi possível obter  $8,82 \text{ mg g de célula}^{-1} \text{ h}^{-1}$  de poli-hidroxicanoato a partir da bactéria *Zobellella denitrificans* MW1. Em Mothes, Schnorpfeil e Ackermann (2007), utilizou-se as bactérias *Paracoccus denitrificans* e *Cupriavidus necator* JMP 134 para a produção de poli-hidroxi-butirato e observou-se que utilizando glicerol puro e glicerol cru, resultante da produção de biodiesel, o conteúdo do polímero no interior da célula foi 70 e 48% da massa celular seca, respectivamente. No trabalho descrito por Costa e colaboradores (2009), foi utilizado o glicerol como fonte de carbono para a produção de ramnolipídeos e poli-hidroxicanoatos por *Pseudomonas aeruginosa* e verificou-se que as produções dos compostos foram respectivamente  $264,2 \text{ mg L}^{-1}$  e 22,2% da massa celular seca. Não há relatos na literatura de produção de alginato utilizando a glicerina como fonte de carbono.

### 3.5.2. Vinhaça

O Brasil é o pioneiro na utilização em larga escala do etanol e reconhecido por suas respostas às crises de escassez de combustíveis fósseis. A produção de cana-de-açúcar está concentrada na região centro-sul, sendo o Estado de São Paulo um dos principais pólos de

produção do país. Entretanto, a indústria sucroalcooleira também contribui para o impacto ambiental com a grande extensão de áreas monocultivadas pelas práticas agrícolas, uso de agrotóxicos, queimada da cana e pela disposição indiscriminada da vinhaça, cuja proporção média é de 13 litros de vinhaça para cada litro de álcool produzido.

A vinhaça é um efluente de destilarias com alto poder poluente e alto valor fertilizante; o poder poluente, cerca de cem vezes maior que o do esgoto doméstico, decorre da sua riqueza em matéria orgânica, baixo pH, elevada corrosividade e altos índices de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), além de elevada temperatura na saída dos destiladores 85-90°C; é considerada altamente nociva à fauna, flora, microfauna e microflora das águas doces, além de afugentar a fauna marinha que vem às costas brasileiras para procriação (SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007).

A vinhaça é composta de substâncias resultantes da transformação do açúcar em etanol, entre estas: água, glicerina, alcoóis superiores, furfural, aldeídos, ácido succínico e acético. Além disso, a elevada concentração de matéria orgânica da vinhaça, aproximadamente 45 g L<sup>-1</sup> expressa em demanda química de oxigênio (DQO) e uma alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), consumindo de 12000 a 20000 mg de oxigênio L<sup>-1</sup> para estabilização das substâncias putrescíveis, faz com que este resíduo apresente risco de contaminação para o lençol freático e os rios (PAULINO et al., 2002; RIBAS, 2006). Outros compostos encontrados em sua composição são: nitrogênio (480-710 mg L<sup>-1</sup>); fósforo (9-200 mg L<sup>-1</sup>); potássio (3340-4600 mg L<sup>-1</sup>); cálcio (1330-4570 mg L<sup>-1</sup>); magnésio (580-700 mg L<sup>-1</sup>); sulfato (3700-3730 mg L<sup>-1</sup>); carbono (8700-12100 mg L<sup>-1</sup>), entre outros compostos (PRADA; GUEKEZIAN; SUÁREZ-IHA, 1998).

Uma aparente solução para o descarte da vinhaça é a fertirrigação, ou seja, a utilização desse produto *in natura*, sem sofrer qualquer tipo de tratamento ou remediação, em áreas de plantio de cana-de-açúcar. A aplicação pode ser realizada por meio de caminhões tanque, sulcos de infiltração, aspersão e utilização de pivôs centrais (OLIVEIRA, 2010). Entretanto, este método de descarte muito utilizado no Brasil gera contaminações de águas subterrâneas (NITAYAVARDHANA; KHANAL, 2010).

A utilização da vinhaça em processos fermentativos está sendo estudada como alternativa para diminuição do impacto ambiental e agregação de valor comercial a este resíduo. No trabalho descrito por Nitayavardhana e Khanal (2010) este resíduo foi empregado na produção de biomassa fúngica, *Rhizopus microsporus* (var. *oligosporus*), para alimentação de peixes. O trabalho desenvolvido por Silva e colaboradores (2011) também utiliza a vinhaça de cana-de-açúcar para a produção de biomassa fúngica, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida*

*parapsilosis*, com a finalidade de suplementação de proteína na alimentação animal. No trabalho de Barrocal e colaboradores (2010) a produção de *Spirulina máxima* foi entre 6-8 g L<sup>-1</sup> utilizando 2 g L<sup>-1</sup> de vinhaça, resultante da produção de etanol a partir da beterraba. No trabalho descrito por Fernandes e colaboradores (2010) utilizou-se vários resíduos para a produção de bio-hidrogênio em reatores anaeróbicos e verificou-se durante as análises que a vinhaça, oriunda da fermentação do milho, foi a mais promissora. No trabalho de Myshkina e colaboradores (2008) estudou-se a produção de poli-hidroxibutirato utilizando *Azotobacter chroococcum* 7B a partir de uma solução de sais adicionada de 25% de vinhaça e o conteúdo do polímero no interior da célula foi 72,5% da massa celular seca. Não há relatos na literatura de produção de alginato utilizando a vinhaça como fonte de carbono.

### 3.5.3. Óleo residual de fritura

A fritura por imersão é um processo em que se utiliza óleos ou gorduras vegetais como meio de transferência de calor, cuja importância é indiscutível para a produção de alimentos em lanchonetes e restaurantes comerciais ou industriais em nível mundial. Em estabelecimentos comerciais se utilizam fritadeiras elétricas descontínuas com capacidades que variam de 15 a 350 litros, cuja operação normalmente atinge temperaturas entre 180 - 200°C. Já em indústrias de produção de empanados, salgadinhos e congêneres, o processo de fritura é normalmente contínuo e a capacidade das fritadeiras pode ultrapassar 1000 litros. O tempo de utilização do óleo varia de um estabelecimento para outro, principalmente pela falta de legislação que determine a troca do óleo usado. Por essa razão, considerando a grande diversidade de estabelecimentos que utilizam esses óleos, é difícil fazer um levantamento preciso da disponibilidade desse resíduo em grandes centros urbanos (COSTA NETO et al., 2000).

O problema está no modo de descarte deste resíduo, pois caso seja despejado no solo, esse impede a infiltração da água destruindo a vegetação. Cada litro de óleo pode contaminar até 20 mil litros de água, uma vez que muitas residências jogam-no na rede de esgoto. O óleo, sendo menos denso que a água, acaba ficando na superfície, dificultando a passagem de luz e oxigenação da água, comprometendo a base da cadeia alimentar aquática, o fitoplâncton (CASTELLANELLI, 2008). Além de gerar muitos problemas de higiene e mau cheiro, os óleos e gorduras presentes na rede de esgoto causam o entupimento da mesma, bem como, o mau funcionamento das estações de tratamento, além de aumentar o custo do tratamento em aproximadamente 16%.

O óleo residual de fritura pode ser utilizado tanto para a produção de sabão, biodiesel e também para a produção de biomoléculas por meio da conversão microbiana deste resíduo. No trabalho descrito por Costa e colaboradores (2009), foi utilizado como fonte de carbono o óleo residual de fritura para a produção de ramnolipídeos e poli-hidroxicanoatos por *Pseudomonas aeruginosa* com produções de 273,1 mg L<sup>-1</sup> e 50,4% da massa celular seca, respectivamente. A *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (NCBIM 40044) foi utilizada como produtora de poli-hidroxicanoato a partir de óleo residual de fritura por Haba e colaboradores (2007) e verificou-se que a máxima produção deste polímero foi a 37°C com 8,2 mg de PHA g de célula<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Em Fernández e colaboradores (2005), foi utilizada a *Pseudomonas aeruginosa* NCIMB 40045 para a produção de poli-hidroxicanoato e verificou-se que utilizando o óleo residual de fritura (20 g L<sup>-1</sup>) a acumulação do polímero foi de 66,1% da massa celular seca, enquanto que utilizando a glicose (20 g L<sup>-1</sup>) o valor foi de apenas 16,8%. Não há relatos na literatura de produção de alginato utilizando óleo residual de fritura como fonte de carbono.

#### 3.5.4. Manipueira

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta da família das euforbiáceas e serve de alimento básico para mais de 800 milhões de pessoas em todo o mundo.

Os estudiosos apontam o Continente Americano, mais precisamente o centro do Brasil, como região de origem e dispersão da planta. Fundamentam-se os defensores dessa teoria no fato de se concentrarem nesta região a maioria das espécies selvagens do gênero *Manihot* em estado espontâneo. Sua dispersão após o descobrimento do País estendeu-se à África e depois ao Continente Asiático, destacando-se a Tailândia e Indonésia, alcançando hoje cerca de 80 países (PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2011).

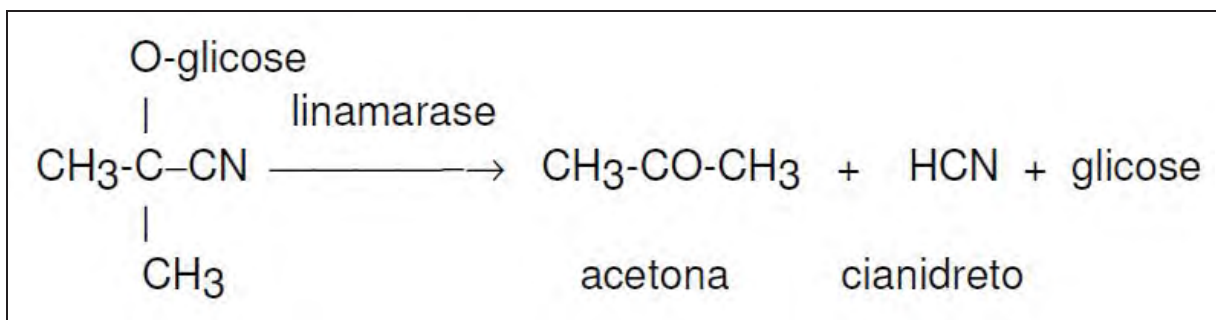
A mandioca faz parte do contexto histórico brasileiro, está presente nos planos alimentar, social, econômico e cultural do povo, sendo uma cultura de subsistência, em especial na região semi-árida do Nordeste, mitigando a fome das populações mais pobres do Brasil. O plantio da mandioca apresenta duas características básicas que o diferenciam das demais culturas econômicas: a resistência à seca, permitindo seu cultivo em regiões onde outras culturas alimentares não conseguem se estabelecer e a capacidade de adaptação em solos de baixa fertilidade. Essas vantagens naturais que a planta apresenta parecem explicar o menor cuidado dos pequenos produtores no seu cultivo, determinando o baixo rendimento

nacional, estimado entre 10 a 12 toneladas de raízes por hectare (PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2011).

O Brasil é o segundo produtor mundial, com 26 milhões de toneladas, sendo superado pela Nigéria. A produção brasileira voltada principalmente para a variedade de mandioca brava destinada a fins industriais, como o fabrico de farinha e a extração da fécula ou goma ou polvilho. Em menor escala, são cultivadas as variedades de mesa, também chamadas de mandioca mansa, aipim ou macaxeira; diferem das mandiocas bravas por conterem baixos teores de ácido cianídrico, composto tóxico existente nas raízes e também nas folhas (PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2011).

O produto mais nobre da planta, a fécula, passa a ocupar destacada importância econômica na substituição parcial do trigo, a maior parte importada, podendo estar presente em porcentagens de 10% a 20 % na fabricação do pão francês e em proporções maiores na confecção de outros produtos de panificação. Sua maior utilização ocorre no campo industrial, como ingrediente de qualidade na indústria têxtil, de papéis, colas, tintas, embutidos de carne, cervejarias, cosméticos, produtos de confeitaria, na indústria petrolífera - neste caso, no preparo de pastas para resfriamento de brocas de perfuração em altas temperaturas – e, mais recentemente, como embalagens biodegradáveis em substituição aos derivados do petróleo. É relatada a aplicação do amido de mandioca em mais de 800 usos (PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2011).

Os moinhos de farinha de mandioca produzem resíduos sólidos e líquidos, sendo este último formado pela água de lavagem e da água extraída das raízes por prensagem (manipueira) (BARANA; CEREDA, 2000). A manipueira é tóxica devido à presença do composto linamarina, representante do grupo dos glicosídeos cianogênicos. Este composto sob ação da enzima linamarase, presente nos tecidos da própria raiz, a linamarina decompõe-se, liberando, entre outras substâncias, o cianidreto (HCN) (Figura 11).



**Figura 11.** Conversão enzimática da linamarina em cianidreto nos tecidos da mandioca. Retirado de Universidade de São Paulo (2011).

A linamarina ocorre em maiores quantidades na casca da raiz, entretanto a polpa branca comestível contém quantidades consideráveis do glicosídeo (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2011).

Além da toxicidade da manipueira existe também uma alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), a qual varia entre 14000 mg L<sup>-1</sup> até 34000 mg L<sup>-1</sup> (NASU, 2008). A manipueira apresenta em sua composição minerais, tais como: P (159,56 ppm); K (1750 ppm); Ca (200,0 ppm); Mg (390 ppm); Fe (16 ppm); Zn (2,7 ppm); Cu (1,25 ppm); Mn (2,75 ppm); além de 94,20 g glicose L<sup>-1</sup> e 1,5 g L<sup>-1</sup> de nitrogênio total (CEREDA, 2001).

A preocupação com o resíduo manipueira é bastante significativa, já que a produção da farinha de mandioca gera entre 267 a 419 litros desse resíduo para cada tonelada de raiz processada. O resíduo gerado nas indústrias tem como destino as lagoas de estabilização, na qual sofre ação de agentes naturais, tais como fotodecomposição, precipitação e atividade microbiana local. O resíduo tende a penetrar no solo, alcançando lençóis freáticos e contaminando aquíferos, além de produzir odor desagradável, atrair insetos e degradar a vegetação adjacente. Nas lagoas de estabilização não ocorre qualquer tratamento adicional no sentido da otimização do processo, para o aproveitamento deste efluente como um subproduto (CAMILI; CABELLO, 2007).

Desse modo, as aplicações deste resíduo em diversas áreas têm sido estudadas, tanto na produção caseira de fertilizante natural, defensivos agrícolas, na alimentação animal, produção de vinagre e sabão, como ainda em conversões microbiológicas deste resíduo em compostos de alto valor agregado.

No trabalho de Costa e colaboradores (2009) a manipueira e uma mistura de manipueira adicionada de óleo residual de fritura foram utilizadas como fonte de carbono para a produção de ramnolipídeos e poli-hidroxicanoatos por *Pseudomonas aeruginosa*. Verificou-se que somente com a manipueira como fonte de carbono a produção de ramnolipídeos foi de 300,3 mg L<sup>-1</sup> e PHA de 17,6% da massa celular seca, enquanto que a mistura de manipueira adicionada de óleo residual de fritura a produção de ramnolipídeos foi de 609,1 mg L<sup>-1</sup> e PHA de 39% da massa celular seca.

A aplicação da manipueira para a geração de eletricidade por células combustíveis microbianas (MFCs) foi estudada por Kaewkannetra, Chiwes e Chiu (2011). Os resultados experimentais mostraram que as MFCs podem gerar eletricidade a partir de uma força total em carga de cianeto de águas residuárias (16000mg COD L<sup>-1</sup>; 86 mg L<sup>-1</sup> cianeto) de 1771 mW m<sup>2</sup> de potência máxima.

Em Avancini e colaboradores (2007) foi estudada a manipueira na alimentação de ratos fêmeas e machos com doses de 0%, 25%, 50% e 100% do resíduo. Nos primeiros 14 dias de ensaio não se observou quaisquer alterações na mortalidade, comportamentos ou sinais clínicos de toxicidade em relação ao grupo controle. Concluiu-se que o resíduo não produziu nenhum efeito sobre o crescimento dos animais, consumo de água ou alimento, classificando a toxicidade como baixa em ratos ( $> 5000 \text{ mg Kg}^{-1}$  de peso corpóreo).

Já em Sreethawong e colaboradores (2010) estudou-se a produção de hidrogênio utilizando o resíduo manipueira para abastecimento dos reatores anaeróbicos. O máximo rendimento foi de 186 mL de  $\text{H}_2 \text{ g}^{-1}$  COD removido, utilizando o resíduo sem a suplementação de nitrogênio. Enquanto que, com a adição de nitrogênio a máxima produção de hidrogênio alcançou o valor de 438 mL de  $\text{H}_2 \text{ g}^{-1}$  COD removido. Não há relatos na literatura de produção de alginato utilizando manipueira como fonte de carbono.

### **3.5.5. Água residual da indústria de refrigerante**

O Brasil está entre os campeões de industrialização e consumo de bebidas gaseificadas, sendo o terceiro maior produtor mundial de refrigerantes, com 11,5 bilhões de litros e faturamento médio anual de R\$ 12 bilhões, sendo superado apenas pelos Estados Unidos e México. O consumo nacional quintuplicou de 1992 a 2002 (com 69 litros por habitante no ano de 2002) ocupando a quarta colocação mundial, atrás de Estados Unidos, México e Alemanha.

A produção de refrigerantes emprega quantidades significativas de água, açúcar cristal,  $\text{CO}_2$  para carbonatação, além de diversos aditivos como conservantes (sorbato de potássio e benzoato de sódio), estabilizantes, acidulantes, corantes, essências (guaraná, cola, limão, laranja, tutti-frutti), entre outros (SANTOS; RIBEIRO, 2005).

Os principais impactos ambientais da fabricação de refrigerantes são: a elevada carga orgânica, a presença de sólidos em suspensão nos efluentes ou a geração de resíduos de rótulos e vasilhames danificados (Tabela 5).

**Tabela 6.** Caracterização do efluente da indústria de refrigerantes (SANTOS; RIBEIRO, 2005)

Parâmetro	Valores de referência das Indústrias de Refrigerantes
DBO (mg L <sup>-1</sup> )	940 - 1335 (1188)
DQO (mg L <sup>-1</sup> )	1616 - 3434 (2149)
Resíduo total (mg L <sup>-1</sup> )	1704 - 2210 (2003)
Resíduo volátil (mg L <sup>-1</sup> )	1292 - 1724 (1532)
Resíduo não filtrável (mg L <sup>-1</sup> )	236 - 655 (495)
Nitrogênio total (mg L <sup>-1</sup> )	22 - 49 (34,6)
Fósforo total (mg L <sup>-1</sup> )	4 - 13 (6,7)
Surfactantes (mg L <sup>-1</sup> )	0,22 - 0,80 (0,45)
Óleos e graxas (mg L <sup>-1</sup> )	69 - 115 (87)
pH	8 - 12,3 (10,2)
Temperatura (°C)	28 - 35 (32)

O processo usual de tratamento desse efluente é constituído de três etapas: preliminar (remoção de areia, separação da água, óleo e peneiramento), primário (correção de pH) e secundário (reator anaeróbio seguido de lodos ativados) (CRUZ, 2007). Logo, a literatura relata vários estudos utilizando reatores anaeróbicos para o tratamento de efluentes de indústrias de bebidas (BORJA; BANKS, 1993; KALYUZHNYI; SAUCEDO; MARTINEZ, 1997; MOURA; TERAN, 2009).

A literatura mostra, ainda, alguns estudos de gerenciamento das águas residuais das Indústrias de Refrigerantes. Entre estes, em Oktay e colaboradores (2007) estudou-se o tratamento para reutilização da água residual de uma indústria que produz 300 ton d<sup>-1</sup> de bebidas energéticas. O planejamento teve como propósito a recuperação e reutilização do açúcar, para isto foi empregado o sistema de filtração por membranas. Por fim, o estudo revelou a necessidade de se descobrir o potencial de utilização deste produto e um estudo da viabilidade do tratamento.

No trabalho desenvolvido por Matošić e colaboradores (2009), foi estudado duas formas para o tratamento de águas residuais provenientes do engarrafamento de água e bebidas refrigerantes. Os resultados do teste piloto mostraram que o biorreator de membrana (MBR) apresentou significativa eficiência no tratamento em relação ao processo de lodo ativado (ASP) convencional. O tratamento com MBR resultou em um efluente com



parâmetros adequados para o descarte, enquanto o realizado com ASP apresentou um efluente impróprio para descarte.

Entretanto, não se encontrou nenhum estudo de produção de biomoléculas utilizando a água residual da indústria de refrigerantes.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado foi o *Azotobacter vinelandii* CCT 2481 obtido da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello” - Campinas - SP.

### 4.2. MEIOS DE CULTURA

#### 4.2.1. Meio de Manutenção

A linhagem do microrganismo *Azotobacter vinelandii* CCT 2481 foi mantida em agar extrato de malte (YMA): extrato de levedura 3,0; extrato de malte 3,0; peptona 5,0; dextrose 10,0; agar 20,0 e água destilada 1,0 litro (Figura 12).



**Figura 12.** *Azotobacter vinelandii* CCT 2481 mantida em agar YM.

#### 4.2.2. Meios de Fermentação

Para a produção de poli-hidroxitbutirato e alginato foi utilizado o meio mínimo ou basal (item 4.2.2.1) acrescidos dos diferentes substratos como fonte de carbono: glicerina P.A., vinhaça, óleo residual de fritura, manipueira e água residual da indústria de refrigerante. Também foram realizados experimentos utilizando-se os substratos *in natura* e sem adição de meio mínimo ou basal.

#### **4.2.2.1. Meio Mínimo ou Basal**

O meio mínimo utilizado foi o descrito por Vargas-García e colaboradores (2002), sendo constituído pelos seguintes componentes (em gramas por litro):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,16;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,64;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,4;  $\text{NaCl}$  0,2;  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,05;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,0025 e  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,001. O pH foi ajustado em 7,0 e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos.

#### **4.2.2.2. Meio Mínimo ou Basal com glicerina P.A. e somente com glicerina P.A.**

As soluções de glicerina P.A. nas concentrações 1%; 3% e 5% foram esterilizadas em autoclave separadamente do meio mínimo ou basal, a 121°C por 20 minutos e misturadas na etapa de fermentação. O mesmo procedimento foi executado para a fermentação com a glicerina P.A., sem adição de meio mínimo ou basal.

#### **4.2.2.3. Meio Mínimo ou Basal com vinhaça e vinhaça *in natura***

As soluções de vinhaça foram ajustadas pela análise de açúcares totais, segundo a metodologia de Dubois e colaboradores (1956) nas concentrações 1%; 3% e 5% e, em seguida, foram esterilizadas em autoclave separadamente do meio mínimo ou basal, a 121°C por 20 minutos e misturadas na etapa de fermentação. O mesmo procedimento foi executado para a fermentação com a vinhaça *in natura*, sem adição de meio mínimo ou basal.

#### **4.2.2.4. Meio Mínimo ou Basal com óleo residual de fritura e óleo residual de fritura *in natura***

As soluções de óleo residual de fritura nas concentrações 1%; 3% e 5% foram esterilizadas em autoclave separadamente do meio mínimo ou basal, a 121°C por 20 minutos e misturadas na etapa de fermentação. O mesmo procedimento foi executado para a fermentação a ser realizada com o óleo residual de fritura *in natura*, sem adição de meio mínimo ou basal.

#### **4.2.2.5. Meio Mínimo ou Basal com manipueira e manipueira *in natura***

As soluções de manipueira foram ajustadas pela análise de açúcares totais, segundo a metodologia de Dubois e colaboradores (1956) nas concentrações 1%; 3% e 5% e, em seguida, foram esterilizadas em autoclave separadamente do meio mínimo ou basal, a 121°C por 20 minutos e misturadas na etapa de fermentação. O mesmo procedimento foi executado para a fermentação com a manipueira *in natura*, sem adição de meio mínimo ou basal.

#### **4.2.2.6. Meio Mínimo ou Basal com água residual da indústria de refrigerante e água residual da indústria de refrigerante *in natura***

O efluente, utilizado como fonte de carbono, foi coletado na indústria de Refrigerantes Arco Íris Ltda. em São José do Rio Preto, SP. As soluções de água residual da indústria de refrigerante foram ajustadas pela análise de açúcares totais, segundo a metodologia de Dubois e colaboradores (1956) nas concentrações 0,02%; 0,05% e 0,08% e, em seguida, foram esterilizadas em autoclave separadamente do meio mínimo ou basal, a 121°C por 20 minutos e misturadas na etapa de fermentação. O mesmo procedimento foi executado para a fermentação com a água residual da indústria de refrigerante *in natura*, sem adição de meio mínimo ou basal.

### **4.3. CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO**

#### **4.3.1. Ativação da cultura**

Células do *Azotobacter vinelandii* CCT 2481 foram repicados, por estrias em esgotamento, tubos contendo Plate Count Agar (PCA) inclinado, os quais foram incubados em estufa a 35°C por 24 horas.

#### **4.3.2. Preparo do Inóculo**

Com a ativação da cultura obtida em 4.3.1, realizou-se a suspensão da cultura de célula bacteriana pela adição de 5,0 mL de caldo nutriente contido no frasco Erlenmeyer (o qual apresentava um total de 50,0 mL de caldo nutriente) e, em seguida, transferiu-se a suspensão

para este mesmo frasco Erlenmeyer. Os frascos foram incubados em agitador orbital rotatório na temperatura de 35°C por 24h e 225 rpm (PAGE; KNOSP, 1989; PAGE; MANCHAK; RUDY, 1992; PAGE et al., 2001; SILVA, 2009).

#### 4.3.3. Fermentação e Produção do PHB e alginato

Em uma cubeta do espectrofotômetro Bel Photonics SP 1105 foram adicionados 2,0 mL do meio mínimo ou basal e também o meio de cultura obtido no preparo do inóculo (item 4.3.2.) até atingir uma densidade ótica de 0,9 no comprimento de onda de 620 nm (PAGE; KNOSP, 1989; BELLENGER; WICHARD; KRAEPIEL, 2008). Através de uma regra de três, foi verificado o volume de inóculo a ser adicionado em cada frasco de Erlenmeyer contendo 50,0 mL do meio de fermentação. Para todos os experimentos realizados, foi padronizado o inóculo inicial de *Azotobacter vinelandii* CCT 2481 em 0,74 mg de peso seco mL<sup>-1</sup>, correspondente à absorvância de 0,9 da suspensão a 620 nm. Logo após, os frascos Erlenmeyer foram incubados em agitador orbital rotatório a 120 rpm, na temperatura de 35°C e tempo de incubação pré-determinado pelo planejamento experimental (item 4.4.).

#### 4.4. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO COM SUBSTRATOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

A produtividade específica do PHB ( $Y_1$  = poli-hidroxi-butirato em mg g de célula<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), do alginato ( $Y_2$  = alginato em mg g de célula<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) e a concentração de biomassa ( $Y_3$  = biomassa em g L<sup>-1</sup>) foram determinadas utilizando um planejamento experimental fatorial completo 3<sup>(2-0)</sup> (para cada fonte de carbono) e as variáveis independentes estudadas foram: X1 = fonte de carbono em g L<sup>-1</sup> (glicerina, vinhaça, óleo residual de fritura, manipueira e água residual da indústria de refrigerante) e X2 = tempo de incubação em horas; resultando em 18 experimentos (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978; MONTGOMERY, 2001; GALDÁMEZ, 2002) (Tabela 6, Tabela 7, Tabela 8, Tabela 9).

**Tabela 7.** Variáveis independentes estudadas no planejamento experimental fatorial completo 3<sup>(2-0)</sup> para a água residual da indústria de refrigerante

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
X1 – fonte de carbono (g L <sup>-1</sup> )	0,2	0,5	0,8
X2 – tempo de incubação (h)	24	48	72

**Tabela 8.** Variáveis independentes estudadas no planejamento experimental fatorial completo  $3^{(2-0)}$  para as fontes de carbono: glicerina, vinhaça, óleo residual de fritura e manipueira

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
X1 – fonte de carbono ( $\text{g L}^{-1}$ )	10,0	30,0	50,0
X2 – tempo de incubação (h)	24	48	72

**Tabela 9.** Delineamento experimental fatorial completo  $3^{(2-0)}$  para a água residual da indústria de refrigerante

Experimento	Replicata	Tempo (h)	Concentração ( $\text{g L}^{-1}$ )
1	1	24	0,20
2	1	24	0,50
3	1	24	0,80
4	1	48	0,20
5	1	48	0,50
6	1	48	0,80
7	1	72	0,20
8	1	72	0,50
9	1	72	0,80
10	2	24	0,20
11	2	24	0,50
12	2	24	0,80
13	2	48	0,20
14	2	48	0,50
15	2	48	0,80
16	2	72	0,20
17	2	72	0,50
18	2	72	0,80

**Tabela 10.** Delineamento experimental fatorial completo  $3^{(2-0)}$  glicerina, vinhaça, óleo residual de fritura e manipueira

Experimento	Replicata	Tempo (h)	Concentração ( $\text{g L}^{-1}$ )
1	1	24	10,00
2	1	24	30,00
3	1	24	50,00
4	1	48	10,00
5	1	48	30,00
6	1	48	50,00
7	1	72	10,00
8	1	72	30,00
9	1	72	50,00

**Continuação da Tabela 11. Delineamento experimental fatorial completo  $3^{(2-0)}$  glicerina, vinhaça, óleo residual de fritura e manipueira**

10	2	24	10,00
11	2	24	30,00
12	2	24	50,00
13	2	48	10,00
14	2	48	30,00
15	2	48	50,00
16	2	72	10,00
17	2	72	30,00
18	2	72	50,00

Durante os experimentos manteve-se o pH inicial em 7,0; a temperatura de incubação em 35°C e a agitação em 120 rpm, segundo os critérios de otimização descritos por Silva (2009).

#### **4.5. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO COM SUBSTRATOS *IN NATURA***

Com a perspectiva de avaliar o efeito das concentrações dos substratos *in natura* no crescimento celular e na produtividade específica do alginato e do PHB realizou-se um experimento em duplicata nos tempos de incubação 24; 48; 72 e 96 h como mostra a Tabela 10.

**Tabela 12. Experimento para os substratos: glicerina, vinhaça, óleo residual de fritura, manipueira e água residual da indústria de refrigerante, todos na concentração *in natura* em diferentes tempos de incubação utilizado no estudo da biomassa, alginato e PHB**

<b>Experimento</b>	<b>Replicata</b>	<b>Tempo (h)</b>
1	1	24
2	1	48
3	1	72
4	1	96
5	2	24
6	2	48
7	2	72
8	2	96

Durante os experimentos manteve-se a temperatura de incubação em 35°C e a agitação em 120 rpm, segundo os critérios de otimização avaliados por Silva (2009).

## 4.7. MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.7.1. Construção da curva de calibração para determinação da concentração celular a partir de suspensões de *Azotobacter vinelandii* CCT 2481 = DSM 85

Para a construção da curva de calibração da concentração celular foi utilizada suspensão de *Azotobacter vinelandii* CCT 2481 obtida após o processo de preparo do inóculo.

A metodologia foi executada da seguinte forma:

Um volume de 50,0 mL de cultura de células de *Azotobacter vinelandii* CCT 2841, obtido nas condições de preparo do inóculo, foi centrifugado a 7077 g a 4°C, durante 15 minutos, e lavado duas vezes com água destilada;

A massa celular úmida foi ressuspensa em 50,0 mL de água destilada (suspensão original) e posteriormente foram preparadas diferentes diluições;

Um volume de 5,0 mL de suspensão celular original e de cada diluição de suspensão de células foi colocado em cadinhos de porcelana, anteriormente secos em mufla a 550°C por 2h e pesados em balança analítica;

Os cadinhos, contendo a suspensão celular original e as diferentes diluições, foram colocados em estufa a 90°C por 24h;

Os cadinhos foram transferidos para um dessecador, contendo cristais de sílica, e mantidos à temperatura ambiente por 30 minutos para resfriamento;

Os cadinhos foram pesados em balança analítica, transferidos novamente para a estufa e após 24h, novamente pesados, a fim de confirmar a constância das medições;

Uma vez conhecidos o volume e a massa de células, esta última obtida pela subtração do peso dos cadinhos com células e do peso dos cadinhos vazios, foi determinada a concentração celular da suspensão celular original e das amostras que foram diluídas;

Paralelamente, foram feitas leituras de absorvância a 620 nm no espectrofotômetro Bel Photonics SP 1105 com a amostra da suspensão celular original e com as diluídas;

Com base nas absorvâncias das amostras diluídas e da suspensão original, construiu-se a curva de calibração, relacionando a absorvância com a concentração celular em  $\text{mg mL}^{-1}$  (Apêndice, Figura 25).



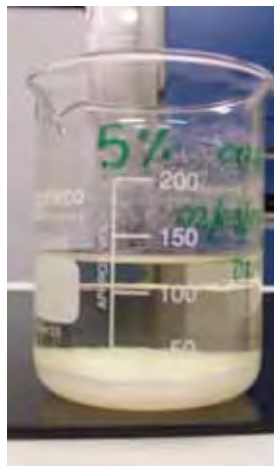
#### 4.7.2. Determinação da biomassa

A massa celular foi determinada medindo-se no espectrofotômetro a 620 nm uma suspensão de células em água destilada, após separação das mesmas por centrifugação a 7077 g, 15 minutos a 4°C na centrífuga Jouan GR20.22. Previamente, foi obtida a curva de correlação de absorvância versus concentração celular (Apêndice, Figura 25). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.7.3. Processo de extração do PHB e alginato

As células foram separadas do meio fermentado por centrifugação a 7077 g durante 15 minutos a 4°C na centrífuga Jouan GR20.22.

Após esse procedimento, fez-se a retirada do PHB intracelular com clorofórmio. Para isto, utilizou-se a proporção de 100 mL de clorofórmio para cada 1-2 gramas de células e a mistura permaneceu em refluxo por 15 minutos na temperatura de 61°C. A seguir, separou-se o PHB do material celular por meio da filtração seguida de precipitação com etanol absoluto e, o precipitado foi seco em estufa à vácuo à 45°C até peso constante (PUNRATTANASIN, 2001) (Figura 13).



**Figura 13.** Precipitação do PHB com etanol absoluto.

O sobrenadante obtido na centrifugação foi utilizado para a obtenção do alginato. Desse modo, adicionou-se 3V de etanol absoluto para a precipitação do alginato, o qual foi seco em estufa à vácuo a 45°C até peso constante (Figura 14).



*Figura 14. Precipitação do alginato com etanol absoluto.*

#### **4.7.4. Purificação do PHB e alginato**

A purificação foi realizada dissolvendo-se o PHB em hidróxido de sódio 1 N precipitando-o novamente com etanol absoluto (LIN; SADOFF, 1968; POUTON; AKHTAR, 1996). O alginato seco foi dissolvido em água destilada e precipitado novamente com etanol absoluto. Ambos os procedimentos foram repetidos três vezes.

#### **4.7.5. Determinação da pureza do PHB**

A determinação da pureza do PHB foi realizada segundo a metodologia de Law e Slepecky (1961) baseada na reação, à quente, do polímero obtido (PHB) com ácido sulfúrico concentrado de alta pureza analítica resultando em ácido crotônico, cuja absorbância é medida no comprimento de onda de 235 nm.

Para isto, preparou-se amostras contendo de 10 a 50  $\mu\text{g}$  de PHB (marca Sigma-Aldrich, com 100% de pureza) em 1 mL de clorofórmio P.A. Em seguida, o clorofórmio foi evaporado e adicionou-se 10 mL de ácido sulfúrico concentrado no tubo de ensaio, seguido de aquecimento em banho-maria a 100°C por 10 minutos. Posteriormente, resfriou-se a solução e a absorbância do ácido crotônico formado foi medida com uma cubeta de quartzo a 235 nm utilizando ácido sulfúrico como branco (LAW; SLEPECKY, 1961; VAN-THUOC et al., 2008, TEEKA et al., 2010).

A curva padrão de absorbância (235 nm) versus concentração do padrão de PHB ( $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ácido sulfúrico) encontra-se no Apêndice, Figura 30.

#### **4.7.6. Determinação de açúcares totais e redutores**

A determinação de açúcares redutores (AR) baseou-se na metodologia de Somogyi (1952) e Nelson (1944), na qual os glicídeos redutores aquecidos em meio alcalino, transformam-se em enedióis que reduzem o íon cúprico presente a cuproso. O óxido cuproso assim formado reduz a reação arsênio-molibdico a óxido de molibdênio de coloração azul, cuja intensidade de cor é proporcional a quantidade de açúcares redutores existentes na amostra. A determinação de açúcares redutores e totais (ART) foi realizada segundo a metodologia descrita por Dubois e colaboradores (1956), a qual emprega o reagente fenol-sulfúrico. As curvas de calibração para a determinação de AR e ART encontram-se no Apêndice, Figura 27 e 28, respectivamente.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. GLICERINA

#### 5.1.1. Glicerina em diferentes concentrações

Com o estudo da Análise de Variância (ANOVA) pelo software STATISTICA 7.0, observou-se no planejamento estatístico fatorial fracionado  $3^{(2-0)}$  que a variável tempo de incubação e a interação concentração de glicerina e tempo de incubação foram significativas estatisticamente ( $\rho < 0,05$ ) para o aumento da biomassa (Tabela 11). Por meio da metodologia de superfície de resposta pode-se observar que o aumento da biomassa ( $3,34 \text{ g L}^{-1}$ ) foi acompanhado pelo acréscimo no tempo de incubação 80 h, enquanto a faixa de concentração de glicerina testada ( $10\text{-}50 \text{ g L}^{-1}$ ) não influenciou no crescimento bacteriano (Figura 15 e Figura 16).

**Tabela 13.** Planejamento experimental fatorial fracionado  $3^{(2-0)}$  para a glicerina em diferentes concentrações e diferentes tempos de incubação utilizado no estudo da biomassa, alginato e PHB com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ( $\rho < 0,05$ )

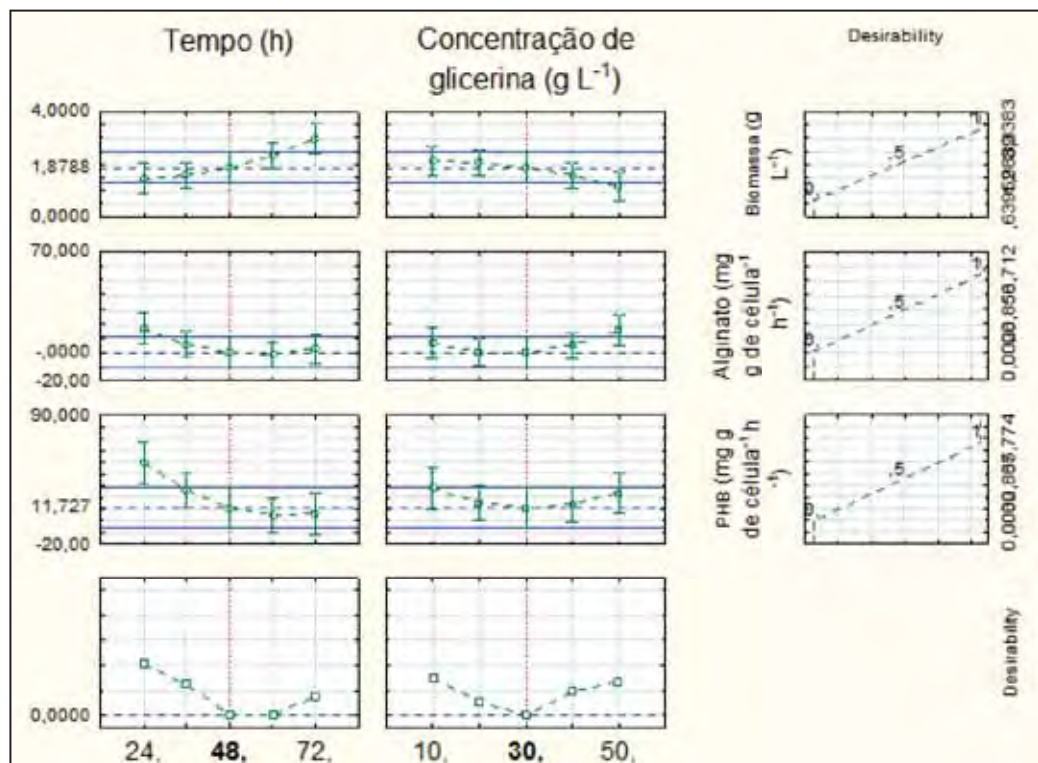
Experimento	Replicata	X1 Concentração de glicerina ( $\text{g L}^{-1}$ )	X2 Tempo (h)	Biomassa	Alginato	PHB
				( $\text{g L}^{-1}$ ) * $\rho = \text{X2}; \text{X1}*\text{X2}$	( $\text{mg g de célula}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) * $\rho = \text{X1}; \text{X2}; \text{X1}*\text{X2}$	( $\text{mg g de célula}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) * $\rho = \text{X2}$
1	1	10,00	24	1,45	8,45	46,78
2	1	30,00	24	1,40	12,47	57,37
3	1	50,00	24	1,53	53,71	31,43
4	1	10,00	48	2,28	12,57	33,69
5	1	30,00	48	1,60	0,00	23,45
6	1	50,00	48	0,64	23,26	23,26
7	1	10,00	72	2,46	0,00	6,92
8	1	30,00	72	3,34	1,07	6,66
9	1	50,00	72	2,58	6,81	8,32
10	2	10,00	24	1,26	0,00	51,21
11	2	30,00	24	1,53	20,70	42,38
12	2	50,00	24	1,07	38,61	65,77
13	2	10,00	48	1,96	0,00	21,28
14	2	30,00	48	2,16	0,00	0,00
15	2	50,00	48	1,68	7,66	25,05
16	2	10,00	72	2,56	0,00	6,02
17	2	30,00	72	2,63	3,79	5,57
18	2	50,00	72	2,73	2,53	6,99

\* $\rho$  = variável independente significativa estatisticamente ( $\rho < 0,05$ ).

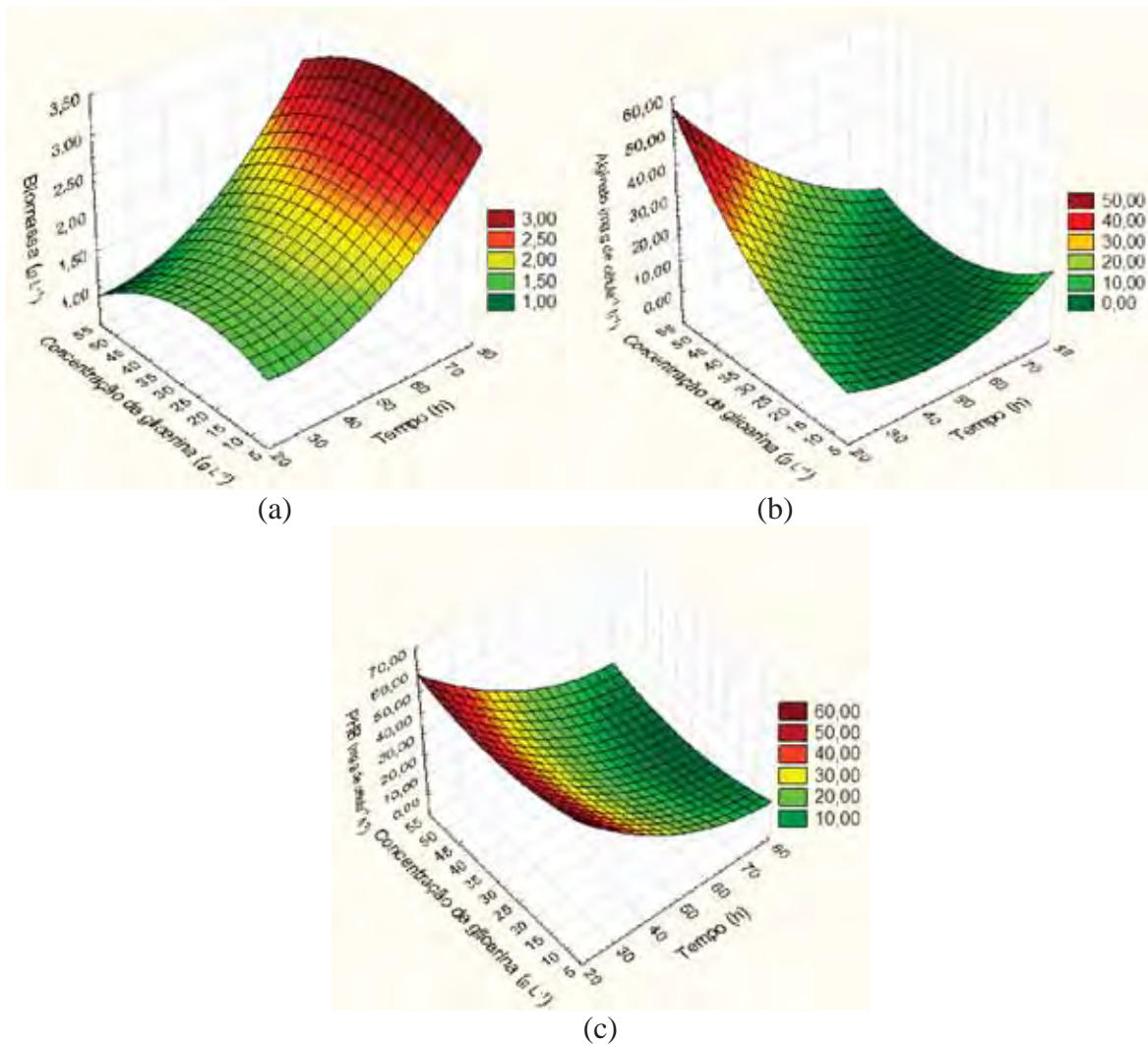
Já para a produtividade de alginato, ambas as variáveis estudadas (concentração de glicerina e tempo de incubação) foram significativas estatisticamente, além da interação entre estas variáveis. Observou-se que a máxima produtividade de alginato ( $53,71 \text{ mg g de célula}^{-1}$

$\text{h}^{-1}$ ) foi na faixa de concentração de glicerina entre 50-55  $\text{g L}^{-1}$ , ou seja, na máxima concentração da fonte de carbono testada e no menor tempo de incubação (20-30 h) (Figura 15 e Figura 16). Não há relatos na literatura de produção de alginato utilizando a glicerina como fonte de carbono.

A produtividade de PHB, com valor máximo de 57,37  $\text{mg g de célula}^{-1} \text{h}^{-1}$ , teve como variável significativa apenas o tempo de incubação, cuja faixa de maior influência positiva foi entre 20-30 h, assim como para a produtividade de alginato. Enquanto a faixa de concentração de glicerina testada (10-50  $\text{g L}^{-1}$ ) não influenciou na produtividade do PHB, assim como foi observado para o crescimento bacteriano (Figura 15 e Figura 16). O estudo desenvolvido por Ibrahim e Steinbüchel (2010) revelou que utilizando-se 15  $\text{g L}^{-1}$  de glicerol puro foi possível obter 8,82  $\text{mg g de célula}^{-1} \text{h}^{-1}$  de poli-hidroxicanoato a partir da bactéria *Zobellella denitrificans* MW1. Embora não haja relatos de estudos utilizando a glicerina como fonte de carbono para *Azotobacter vinelandii* produzir PHB é possível observar que a produtividade encontrada neste estudo é maior que a relatada no estudo citado anteriormente.



**Figura 15.** Perfil para predição de valores e desejabilidade (“Profiles for predicted values and desirability”) do planejamento experimental  $3^{(2-0)}$  para glicerina em diferentes concentrações.



**Figura 16.** Superfícies de resposta para: (a) concentração de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação ( $h$ ) e concentração de glicerina ( $\text{g L}^{-1}$ ) (equação:  $1,64 - 0,030 \cdot x + 0,026 \cdot y + 0,0006 \cdot x \cdot x + 0,0001 \cdot x \cdot y - 0,0006 \cdot y \cdot y$ ); (b) concentração de alginato ( $\text{mg g de célula}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação ( $h$ ) e concentração de glicerina ( $\text{g L}^{-1}$ ) (equação:  $15,92 - 0,68 \cdot x + 0,43 \cdot y + 0,0088 \cdot x \cdot x - 0,019 \cdot x \cdot y + 0,016 \cdot y \cdot y$ ); (c) concentração de PHB ( $\text{mg g de célula}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação ( $h$ ) e concentração de glicerina ( $\text{g L}^{-1}$ ) (equação:  $= 100,04 - 2,05 \cdot x - 0,76 \cdot y + 0,012 \cdot x \cdot x + 0,0008 \cdot x \cdot y + 0,012 \cdot y \cdot y$ ).

A pureza do PHB foi determinada e o PHB extraído apresentou pureza entre 67,31 e 98,27% (Tabela 12).

**Tabela 14.** Pureza do PHB para o experimento  $3^{(2-0)}$  para glicerina em diferentes concentrações

Experimento	Replicata	PHB (mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) *p = X2	Concentração teste de PHB (µg mL <sup>-1</sup> )	Absorbância 235 nm	Concentração determinada (µg mL <sup>-1</sup> )	% Pureza
1	1	46,78	5,00	0,699	4,70	94,10
2	1	57,37	5,00	0,700	4,71	94,23
3	1	31,43	5,00	0,730	4,91	98,27
4	1	33,69	5,00	0,500	3,36	67,31
5	1	23,45	5,00	0,700	4,71	94,23
6	1	23,26	5,00	0,560	3,77	75,39
7	1	6,92	5,00	0,650	4,37	87,50
8	1	6,66	5,00	0,660	4,44	88,85
9	1	8,32	5,00	0,690	4,64	92,89
10	2	51,21	5,00	0,530	3,56	71,35
11	2	42,38	5,00	0,690	4,64	92,89
12	2	65,77	5,00	0,550	3,70	74,04
13	2	21,28	5,00	0,660	4,44	88,85
14	2	0,00	-	-	-	-
15	2	25,05	5,00	0,510	3,43	68,66
16	2	6,02	5,00	0,630	4,24	84,81
17	2	5,57	5,00	0,730	4,91	98,27
18	2	6,99	5,00	0,650	4,37	87,50

### 5.1.2. Glicerina na concentração *in natura*

Realizou-se um experimento em duplicata para glicerina na concentração *in natura* nos tempos de incubação 24; 48; 72 e 96 h. Após a separação das células do sobrenadante não verificou-se a presença de pellet de massa celular, logo a produção de PHB foi considerada nula. Ao sobrenadante adicionou-se etanol conforme a metodologia descrita no item 4.7.3. e não observou-se a formação de precipitado, constatando que não houve a produção de alginato (Tabela 13).

**Tabela 15.** Experimento para a glicerina *in natura* em diferentes tempos de incubação utilizado no estudo da biomassa, alginato e PHB

Experimento	Replicata	Tempo (h)	Biomassa (g L <sup>-1</sup> )*
1	1	24	0,012
2	1	48	0,016
3	1	72	0,019
4	1	96	0,022
5	2	24	0,022
6	2	48	0,020
7	2	72	0,018
8	2	96	0,018

\*O valor médio e o desvio padrão da biomassa considerando todos os tempos de incubação foi de 0,019 ± 0,0031 g L<sup>-1</sup>.

Com isto, verificou-se que a glicerina *in natura* não é uma fonte de carbono recomendável para a produção de biomassa, PHB e alginato por *Azotobacter vinelandii*, sendo preferível utilizar a glicerina em diferentes concentrações, como por exemplo, a faixa de 10-50 g L<sup>-1</sup> (Tabela 13).

Entretanto, no trabalho de Freitas e colaboradores (2010), o glicerol puro foi utilizado como fonte de carbono para produção de um novo exopolissacarídeo sintetizado por *Pseudomonas oleovorans* NRRLB – 14682, cuja produtividade foi de 0,083 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Teeka e colaboradores (2010) isolaram bactérias produtoras de poli-hidroxicanoatos, presentes no solo e em diferentes ambientes de águas contaminadas. Na pesquisa realizada, verificou-se que a produtividade de poli-hidroxicanoato em glicerol puro foi de 3,26 mg g de célula<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para a bactéria denominada AIK7. Mothes, Schnorpfeil e Ackermann (2007) utilizaram as bactérias *Paracoccus dinitrificans* e *Cupriavidus necator* JMP 134 para a produção de poli-hidroxi-butirato e observaram que utilizando glicerol puro e glicerol cru, resultante da produção de biodiesel, o conteúdo do polímero no interior da célula foi 70 e 48% da massa celular seca, respectivamente. No trabalho descrito por Costa e colaboradores (2009), foi utilizado o glicerol como fonte de carbono para a produção de ramnolipídeos e poli-hidroxicanoatos por *Pseudomonas aeruginosa* e verificou-se que as produções dos compostos foram respectivamente 264,2 mg L<sup>-1</sup> e 22,2% da massa celular seca.

## 5.2. VINHAÇA

### 5.2.1. Vinhaça em diferentes concentrações

O estudo da Análise de Variância (ANOVA) para a vinhaça em diferentes concentrações como fonte de carbono no crescimento celular revelou que apenas a variável concentração de vinhaça foi significativa estatisticamente ( $p < 0,05$ ), enquanto o fator tempo não influenciou a produção de biomassa (Tabela 14). Nota-se este fato na metodologia de superfície de resposta, na qual a biomassa máxima (1,80 g L<sup>-1</sup>) foi favorecida pela concentração de vinhaça na faixa de 15-40 g L<sup>-1</sup>, já o tempo de incubação não influenciou a produção de biomassa (Figura 17 e Figura 18).



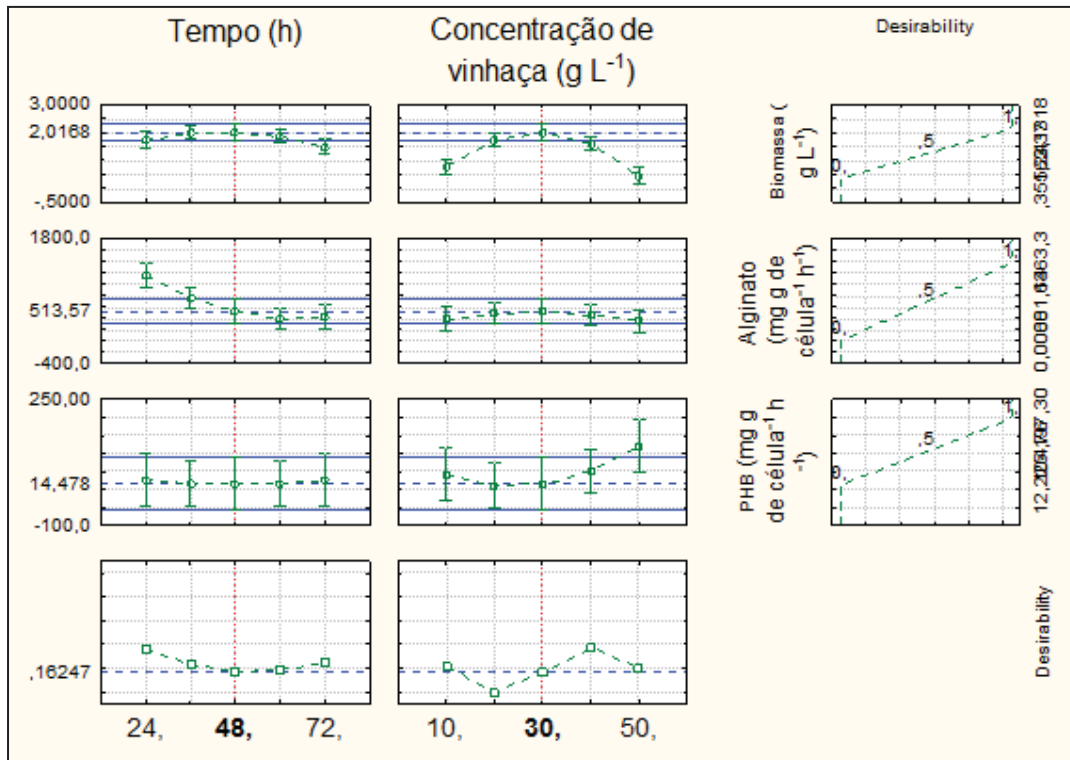
**Tabela 16.** Planejamento experimental fatorial fracionado  $3^{(2-0)}$  para a vinhaça em diferentes concentrações e diferentes tempos de incubação utilizado no estudo da biomassa, alginato e PHB com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ( $p < 0,05$ )

Experimento	Replicata	X1 Concentração de vinhaça (g L <sup>-1</sup> )	X2 Tempo (h)	Biomassa	Alginato	PHB
				(g L <sup>-1</sup> ) * $p = X1$	(mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) * $p = X1; X2; X1*X2$	(mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) * $p = X1$
1	1	10,00	24	0,85	656,39	76,40
2	1	30,00	24	1,68	1363,27	28,07
3	1	50,00	24	0,68	0,00	167,44
4	1	10,00	48	0,77	350,12	28,94
5	1	30,00	48	2,13	441,21	16,73
6	1	50,00	48	0,56	285,84	44,83
7	1	10,00	72	0,83	222,68	48,38
8	1	30,00	72	1,65	382,89	15,74
9	1	50,00	72	0,46	176,12	60,43
10	2	10,00	24	0,96	856,88	38,01
11	2	30,00	24	1,81	932,80	21,47
12	2	50,00	24	0,51	0,00	79,90
13	2	10,00	48	0,80	403,24	56,46
14	2	30,00	48	1,90	585,93	12,23
15	2	50,00	48	0,36	398,83	197,30
16	2	10,00	72	0,70	320,54	36,02
17	2	30,00	72	1,33	467,86	34,98
18	2	50,00	72	0,97	0,00	125,27

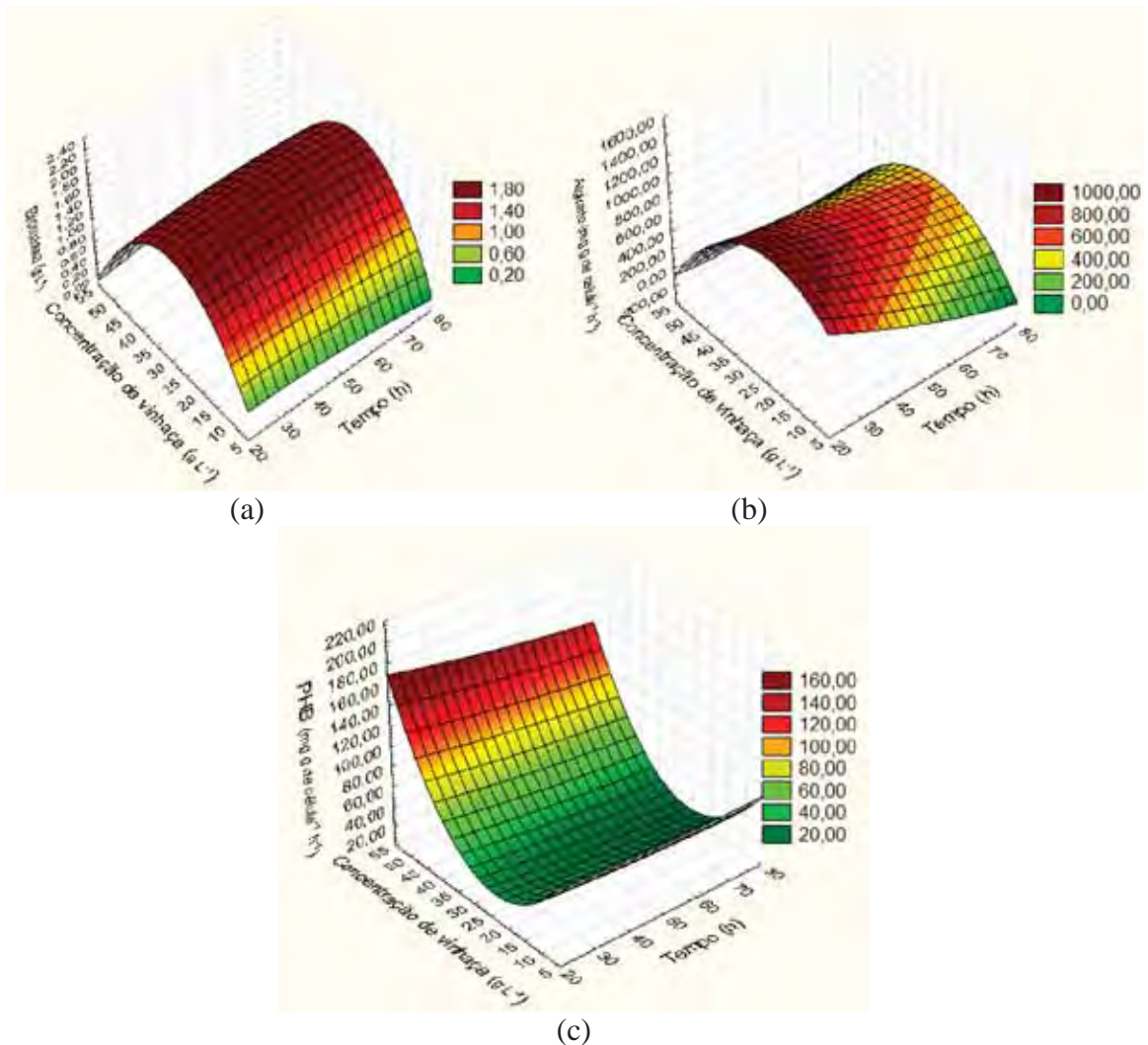
\*  $p =$  variável independente significativa estatisticamente ( $p < 0,05$ ).

A produtividade de alginato foi máxima (1000 mg g de célula<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) entre 20-30 h de incubação e na concentração de vinhaça na faixa de 15-40 g L<sup>-1</sup>, semelhante à melhor faixa de concentração para a biomassa (Figura 17 e Figura 18). Com o estudo da Análise de Variância (ANOVA) notou-se que todas as variáveis foram significativas estatisticamente, assim como a interação tempo de incubação e concentração de vinhaça. Não há relatos na literatura de produção de alginato utilizando a vinhaça como fonte de carbono.

O estudo da Análise de Variância (ANOVA) para a produtividade de PHB revelou que apenas a variável concentração de vinhaça foi significativa estatisticamente. Com a metodologia de superfície de resposta observou-se que a produtividade máxima de PHB foi de 170 mg g de célula<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> na concentração de vinhaça entre 50-55 g L<sup>-1</sup>, enquanto o tempo de incubação não influenciou na produtividade do polímero (Figura 17 e Figura 18). Na literatura apenas foi encontrado um artigo relacionado com a produção de PHB a partir de vinhaça e neste trabalho de Myshkina e colaboradores (2008) estudou-se a produção de poli-hidroxi-butirato utilizando *Azotobacter chroococcum* 7B a partir de uma solução de sais adicionada de 25% de vinhaça e o conteúdo do polímero no interior da célula foi 72,5% da massa celular seca.



**Figura 17.** Perfil para predição de valores e desejabilidade (“Profiles for predicted values and desirability”) do planejamento experimental  $3^{(2-0)}$  para vinhaça em diferentes concentrações.



**Figura 18.** Superfícies de resposta para: (a) biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação ( $h$ ) e concentração de vinhaça ( $\text{g L}^{-1}$ ) (equação:  $-0,31+0,0025*x+0,14*y-8,9972E-5*x*x+0,0001*x*y-0,0026*y*y$ ); (b) concentração de alginato ( $\text{mg g de célula}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação ( $h$ ) e concentração de vinhaça ( $\text{g L}^{-1}$ ) (equação:  $990,08-22,97*x+36,02*y+0,065*x*x+0,30*x*y-0,97*y*y$ ); (c) concentração de PHB ( $\text{mg g de célula}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação ( $h$ ) e concentração de vinhaça ( $\text{g L}^{-1}$ ) (equação:  $112,62-0,33*x-6,74*y+0,0028*x*x-0,0082*x*y+0,15*y*y$ ).

A pureza do PHB foi determinada entre 46,44 e 99,35% (Tabela 15).

**Tabela 17.** Pureza do PHB para o experimento  $3^{(2-0)}$  para vinhaça em diferentes concentrações

Experimento	Replicata	PHB (mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) p = X1	Concentração teste de PHB (µg mL <sup>-1</sup> )	Absorbância 235 nm	Concentração determinada (µg mL <sup>-1</sup> )	% Pureza
1	1	76,40	5,00	0,600	4,03	80,77
2	1	28,07	5,00	0,567	3,81	76,33
3	1	167,44	5,00	0,660	4,44	88,85
4	1	28,94	5,00	0,510	3,43	68,66
5	1	16,73	5,00	0,630	4,24	84,81
6	1	44,83	5,00	0,667	4,48	89,79
7	1	48,38	5,00	0,712	4,79	95,85
8	1	15,74	5,00	0,658	4,42	88,58
9	1	60,43	5,00	0,520	3,50	70,00
10	2	38,01	5,00	0,650	4,37	87,50
11	2	21,47	5,00	0,738	4,96	99,35
12	2	79,90	5,00	0,345	2,32	46,44
13	2	56,46	5,00	0,730	4,91	98,27
14	2	12,23	5,00	0,518	3,48	69,73
15	2	197,30	5,00	0,630	4,24	84,81
16	2	36,02	5,00	0,720	4,84	96,93
17	2	34,98	5,00	0,670	4,51	90,20
18	2	125,27	5,00	0,598	4,02	80,50

### 5.2.2. Vinhaça na concentração *in natura*

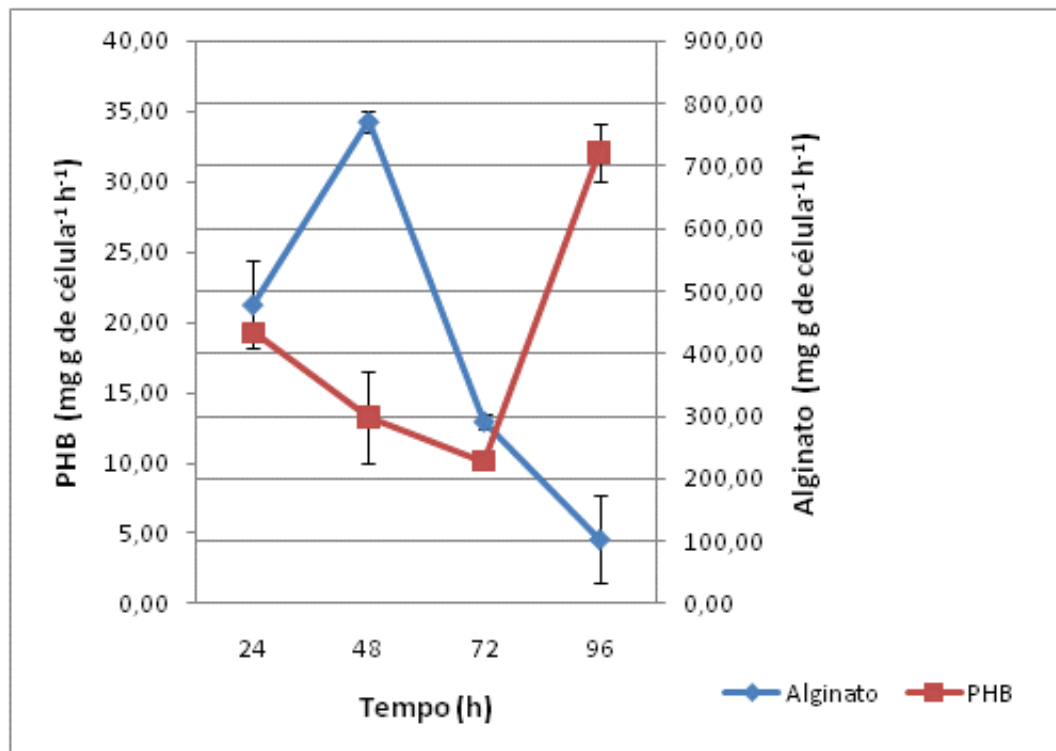
Realizou-se um experimento em duplicata para vinhaça na concentração *in natura* nos tempos de incubação 24; 48; 72 e 96 h. Observou-se que a maior concentração de biomassa (1,27 g L<sup>-1</sup>) foi em 96 h de fermentação, assim como para a máxima produtividade de PHB (32,04 mg g de célula<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Já a máxima produtividade de alginato foi de 771,58 mg g de célula<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> em 48 h de fermentação (Tabela 16 e 17, Figura 19).

**Tabela 18.** Experimento para a vinhaça *in natura* em diferentes tempos de incubação utilizado no estudo da biomassa, alginato e PHB

Experimento	Replicata	Tempo (h)	Biomassa (g L <sup>-1</sup> )	Alginato (mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	PHB (mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
1	1	24	0,83	429,86	19,22
2	1	48	0,47	782,99	11,09
3	1	72	0,88	283,45	10,00
4	1	96	0,80	152,64	33,53
5	2	24	0,78	527,29	19,29
6	2	48	0,47	760,18	15,61
7	2	72	0,84	300,61	10,24
8	2	96	1,74	54,01	30,56

**Tabela 19.** Experimento para a vinhaça in natura e os valores da média e desvio padrão para biomassa, alginato e PHB nos diferentes tempos de incubação

Tempo (h)	Biomassa (g L <sup>-1</sup> )	Alginato (mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	PHB (mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
	0,81 <sup>+/-</sup>	478,57 <sup>+/-</sup>	19,26 <sup>+/-</sup>
24	0,035	68,89	0,049
	0,47 <sup>+/-</sup>	771,58 <sup>+/-</sup>	13,25 <sup>+/-</sup>
48	0,0054	16,12	3,20
	0,86 <sup>+/-</sup>	292,03 <sup>+/-</sup>	10,12 <sup>+/-</sup>
72	0,024	12,14	0,17
	1,27 <sup>+/-</sup>	103,33 <sup>+/-</sup>	32,04 <sup>+/-</sup>
96	0,67	69,74	2,10



**Figura 19.** Experimento com vinhaça in natura contendo os valores de alginato e poli-hidroxibutirato em função do tempo de incubação. O valor médio de biomassa, considerando todos os tempos de incubação, foi de 0,85<sup>+/-</sup>0,18 g L<sup>-1</sup>.

Comparando ambos os estudos realizados, com a vinhaça em diferentes concentrações e a vinhaça *in natura*, observa-se que os resultados máximos de produção de biomassa,

produtividade de alginato e PHB foram mais elevados quando utilizou-se a vinhaça em diferentes concentrações. Este fato está relacionado com a baixa concentração de açúcares totais na vinhaça *in natura*, apenas  $7,66 \text{ g L}^{-1}$ , enquanto a faixa utilizada para o estudo da vinhaça em diferentes concentrações foi de  $10\text{-}50 \text{ g L}^{-1}$ .

O PHB extraído apresentou pureza entre 78,08 e 95,58% (Tabela 18).

**Tabela 20.** Pureza do PHB para o experimento com vinhaça *in natura*

Experimento	Replicata	Tempo (h)	Concentração			
			teste de PHB ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Absorbância 235 nm	Concentração determinada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% Pureza
1	1	24	5,00	0,600	4,03	80,77
2	1	48	5,00	0,710	4,77	95,58
3	1	72	5,00	0,680	4,57	91,54
4	1	96	5,00	0,710	4,77	95,58
5	2	24	5,00	0,580	3,90	78,08
6	2	48	5,00	0,700	4,71	94,23
7	2	72	5,00	0,670	4,51	90,20
8	2	96	5,00	0,700	4,71	94,23

### 5.3. ÓLEO RESIDUAL DE FRITURA

#### 5.3.1. Óleo residual de fritura em diferentes concentrações

Com o estudo da Análise de Variância (ANOVA) pelo software STATISTICA 7.0 observou-se no planejamento estatístico fatorial fracionado  $3^{(2-0)}$  que nenhuma variável estudada foi significativa estatisticamente ( $p < 0,05$ ) para o aumento da biomassa (Tabela 19). Entretanto, por meio da metodologia de superfície de resposta pode-se observar que o aumento da biomassa ( $1,30 \text{ g L}^{-1}$ ) foi acompanhado pelo tempo de incubação entre 40-60 h, enquanto a melhor faixa de concentração de óleo residual de fritura testada foi entre  $50\text{-}55 \text{ g L}^{-1}$  (Figura 20 e Figura 21).

**Tabela 21.** Planejamento experimental fatorial fracionado  $3^{(2-0)}$  para o óleo residual de fritura em diferentes concentrações e diferentes tempos de incubação utilizado no estudo da biomassa, alginato e PHB com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ( $\rho < 0,05$ )

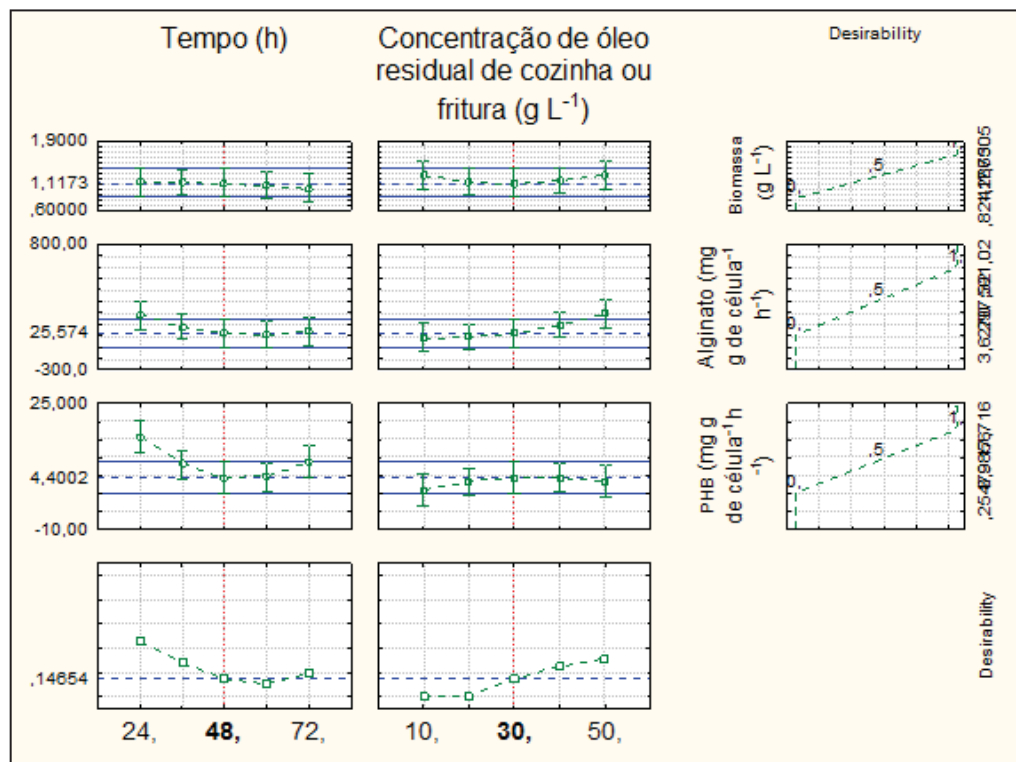
Experimento	Replicata	X1	X2	Biomassa	Alginato	PHB
		Concentração de óleo residual de fritura (g L <sup>-1</sup> )	Tempo (h)	(g L <sup>-1</sup> ) * $\rho$ = nenhum	(mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) * $\rho$ = X1; X2; X1*X2	(mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) * $\rho$ = X2
1	1	10,00	24	1,65	36,40	5,10
2	1	30,00	24	1,03	129,54	17,26
3	1	50,00	24	0,98	591,02	15,79
4	1	10,00	48	1,12	57,65	0,86
5	1	30,00	48	1,11	12,69	4,06
6	1	50,00	48	1,41	128,16	4,03
7	1	10,00	72	1,42	42,88	0,25
8	1	30,00	72	0,82	171,18	6,30
9	1	50,00	72	1,08	112,04	7,92
10	2	10,00	24	1,19	3,63	17,72
11	2	30,00	24	1,03	129,54	17,26
12	2	50,00	24	1,40	407,62	13,66
13	2	10,00	48	1,12	57,65	0,86
14	2	30,00	48	1,11	12,69	4,06
15	2	50,00	48	1,41	128,16	4,03
16	2	10,00	72	0,84	13,74	13,41
17	2	30,00	72	1,40	24,50	9,63
18	2	50,00	72	1,08	112,04	7,92

\*  $\rho$  = variável independente significativa estatisticamente ( $\rho < 0,05$ ).

A produtividade de alginato apresentou como variáveis significativas estatisticamente a concentração de óleo residual de fritura e o tempo de incubação, além da interação entre estas variáveis. Observou-se que a máxima produtividade de alginato (500,00 mg g de célula<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) foi na faixa de concentração de óleo residual de fritura entre 50-55 g L<sup>-1</sup>, ou seja, na máxima concentração da fonte de carbono testada e no menor tempo de incubação (20-30 h) (Figura 20 e Figura 21). Estes mesmos valores de concentração da fonte de carbono e tempo de incubação foram encontrados para a máxima produtividade de alginato utilizando a glicerina como fonte de carbono. Não há relatos na literatura de produção de alginato utilizando óleo residual de fritura como fonte de carbono.

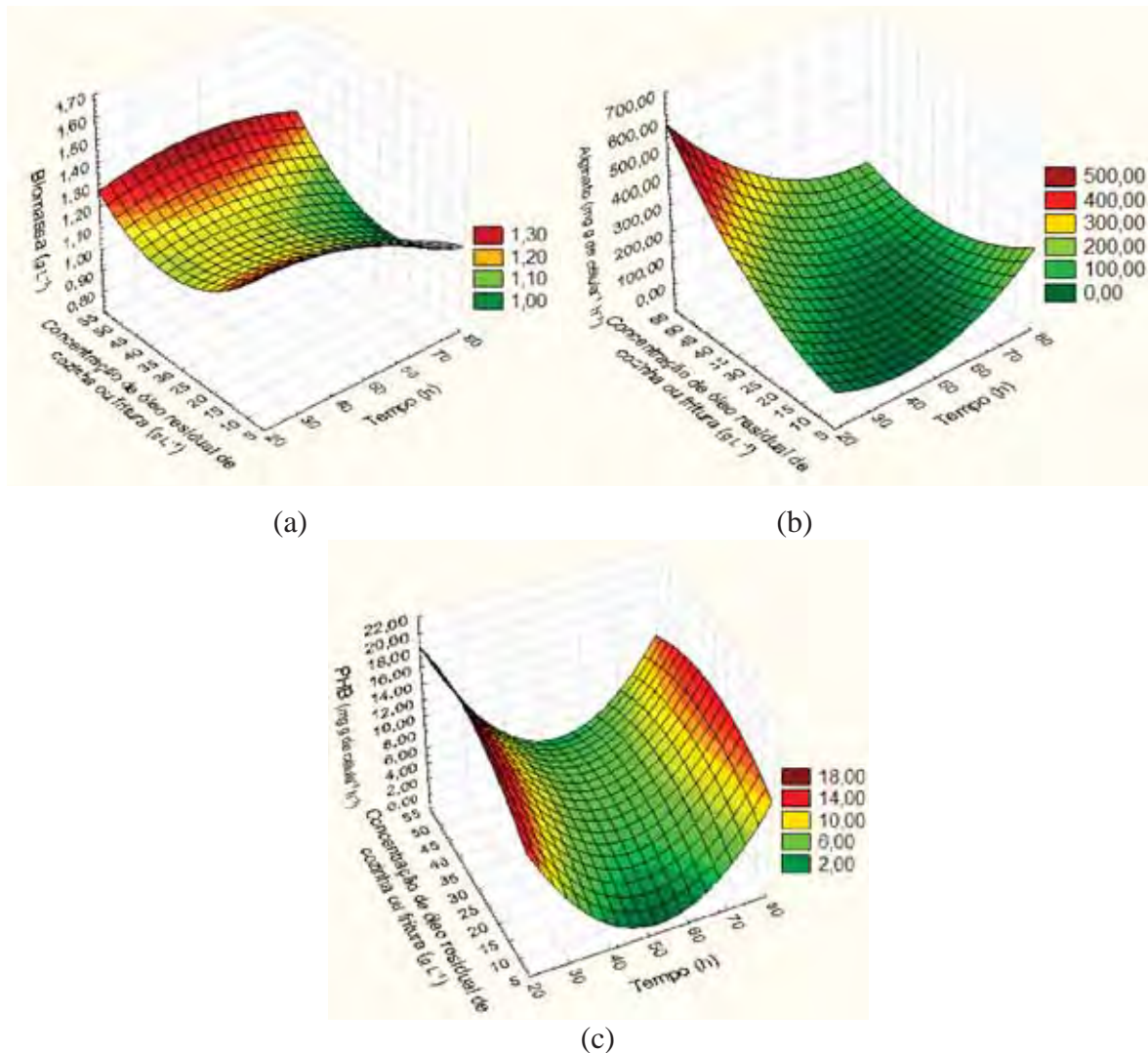
A produtividade de PHB teve como variável significativa apenas o tempo de incubação, cuja faixa de maior influência positiva foi entre 20-30 h, assim como para a produtividade de alginato. Enquanto a faixa de concentração de óleo residual de fritura testada (10-50 g L<sup>-1</sup>) não influenciou na produtividade do PHB (18 mg g de célula<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), assim como foi observado para o estudo realizado com a glicerina em diferentes concentrações (Figura 19 e Figura 20). No trabalho descrito por Costa e colaboradores (2009) foi utilizado como fonte de carbono o óleo residual de fritura para a produção de ramnolipídeos e poli-hidroxicanoatos por *Pseudomonas aeruginosa* com produções de 273,1 mg L<sup>-1</sup> e 50,4% da massa celular seca, respectivamente. A *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (NCBIM 40044) foi

utilizada como produtora de poli-hidroxicanoato a partir de óleo residual de fritura por Haba e colaboradores (2007) e verificou-se que a máxima produção deste polímero foi a 37°C com 8,2 mg de PHA g de célula<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Em Fernández e colaboradores (2005) foi utilizada a *Pseudomonas aeruginosa* NCIMB 40045 para a produção de poli-hidroxicanoato e verificou-se que utilizando o óleo residual de fritura (20 g L<sup>-1</sup>) a acumulação do polímero foi de 66,1% da massa celular seca, enquanto que utilizando a glicose (20 g L<sup>-1</sup>) o valor foi de apenas 16,8%.



**Figura 20.** Perfil para predição de valores e desejabilidade (“Profiles for predicted values and desirability”) do planejamento experimental  $3^{(2-0)}$  para óleo residual de fritura em diferentes concentrações.





**Figura 21.** Superfícies de resposta para: (a) biomassa ( $g L^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e concentração de óleo residual de fritura ( $g L^{-1}$ ) (equação:  $1,47+0,0034*x-0,026*y-8,86E-5*x*x+9,40E-5*x*y+0,0004*y*y$ ); (b) concentração de alginato ( $mg g de célula^{-1} h^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e concentração de óleo residual de fritura ( $g L^{-1}$ ) (equação:  $171,11-10,28*x+6,04*y+0,15*x*x-0,21*x*y+0,15*y*y$ ); (c) concentração de PHB ( $mg g de célula^{-1} h^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e concentração de óleo residual de fritura ( $g L^{-1}$ ) (equação:  $35,09-1,45*x+0,44*y+0,014*x*x-0,0012*x*y-0,0053*y*y$ ).

A pureza do PHB foi determinada e o PHB extraído apresentou pureza entre 69,33 e 99,35% (Tabela 20).

**Tabela 22.** Pureza do PHB para o experimento  $3^{(2-0)}$  para óleo residual de fritura em diferentes concentrações

Experimento	Replicata	PHB (mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) *p = X2	Concentração teste de PHB (µg mL <sup>-1</sup> )	Absorbância 235 nm	Concentração determinada (µg mL <sup>-1</sup> )	% Pureza
1	1	5,10	5,00	0,569	3,83	76,60
2	1	17,26	5,00	0,710	4,77	95,58
3	1	15,79	5,00	0,567	3,81	76,33
4	1	0,86	5,00	0,688	4,63	92,62
5	1	4,06	5,00	0,632	4,25	85,08
6	1	4,03	5,00	0,645	4,34	86,83
7	1	0,25	5,00	0,532	3,58	71,62
8	1	6,30	5,00	0,555	3,73	74,71
9	1	7,92	5,00	0,700	4,71	94,23
10	2	17,72	5,00	0,567	3,81	76,33
11	2	17,26	5,00	0,738	4,96	99,35
12	2	13,66	5,00	0,515	3,46	69,33
13	2	0,86	5,00	0,670	4,51	90,20
14	2	4,06	5,00	0,599	4,03	80,64
15	2	4,03	5,00	0,545	3,66	73,37
16	2	13,41	5,00	0,600	4,03	80,77
17	2	9,63	5,00	0,589	3,96	79,29
18	2	7,92	5,00	0,658	4,42	88,58

### 5.3.2. Óleo residual de fritura *in natura*

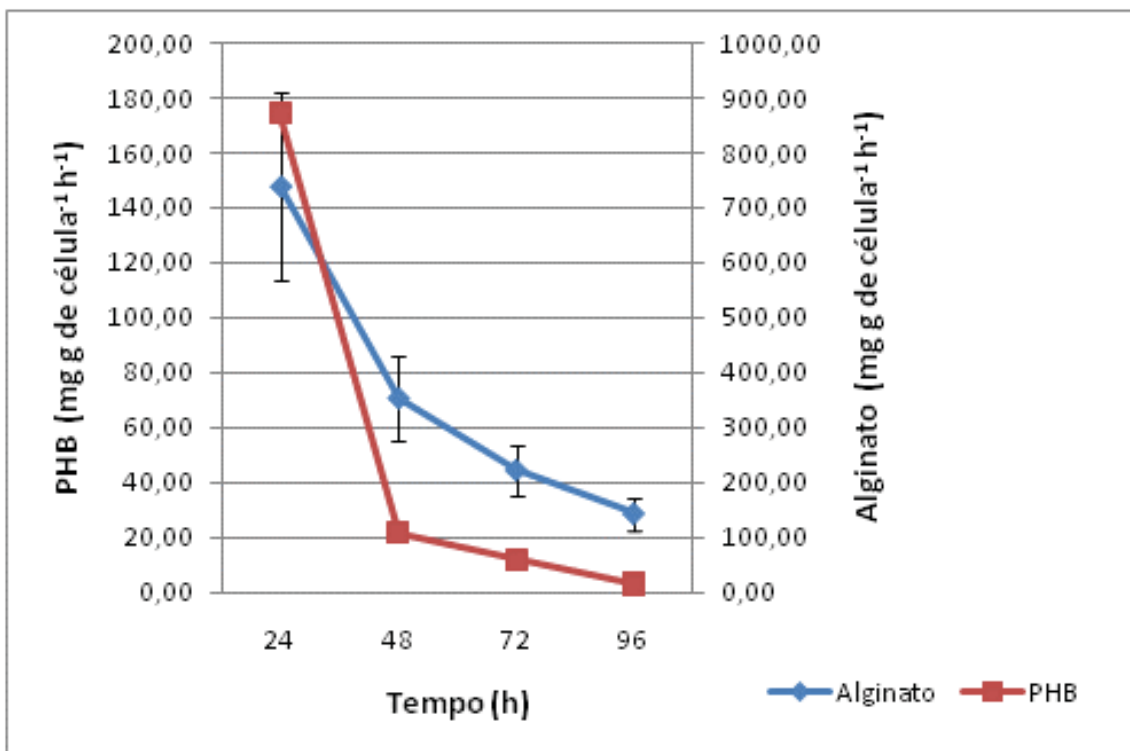
Realizou-se um experimento em duplicata para óleo residual de fritura na concentração *in natura* nos tempos de incubação 24; 48; 72 e 96 h. Observou-se que a maior concentração de biomassa (1,48 g L<sup>-1</sup>) foi em 96 h de fermentação. Já a máxima produtividade de alginato foi de 739,01 mg g de célula<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> em 24 h de fermentação como para a máxima produtividade de PHB (174,40 mg g de célula<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) (Tabela 21 e 22, Figura 22).

**Tabela 23.** Experimento para o óleo residual de fritura *in natura* em diferentes tempos de incubação utilizado no estudo da biomassa, alginato e PHB

Experimento	Replicata	Tempo (h)	Biomassa (g L <sup>-1</sup> )	Alginato (mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	PHB (mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
1	1	24	1,39	617,31	175,85
2	1	48	1,02	408,74	23,62
3	1	72	1,11	254,13	12,54
4	1	96	1,30	163,01	3,93
5	2	24	0,95	860,71	172,94
6	2	48	1,39	297,76	19,56
7	2	72	1,29	189,22	11,06
8	2	96	1,67	121,69	2,11

**Tabela 24.** Experimento para o óleo residual de fritura in natura e os valores da média e desvio padrão para biomassa, alginato e PHB nos diferentes tempos de incubação

Tempo (h)	Biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ )	Alginato ( $\text{mg g de célula}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	PHB ( $\text{mg g de célula}^{-1} \text{h}^{-1}$ )
	1,17 <sup>+/-</sup>	739,01 <sup>+/-</sup>	174,40 <sup>+/-</sup>
24	0,31	172,11	2,06
	1,21 <sup>+/-</sup>	353,25 <sup>+/-</sup>	21,59 <sup>+/-</sup>
48	0,27	78,47	2,88
	1,20 <sup>+/-</sup>	221,68 <sup>+/-</sup>	11,80 <sup>+/-</sup>
72	0,12	45,90	1,05
	1,48 <sup>+/-</sup>	142,35 <sup>+/-</sup>	3,02 <sup>+/-</sup>
96	0,26	29,21	1,29



**Figura 22.** Experimento com óleo residual de fritura in natura contendo os valores de alginato e poli-hidroxi-butilirato em função do tempo de incubação. O valor médio de biomassa, considerando todos os tempos de incubação, foi de 1,26<sup>+/-</sup>0,24  $\text{g L}^{-1}$ .

Comparando ambos os estudos realizados, com o óleo residual de fritura em diferentes concentrações e o óleo residual de fritura *in natura*, observa-se que os resultados máximos de produção de biomassa, produtividade de alginato e PHB foram mais elevados quando utilizou-se o óleo residual de fritura *in natura*. Este fato mostra a excelente adaptação do microrganismo ao óleo residual de fritura e a capacidade de produção de ambos os compostos a partir desta fonte de carbono.

A pureza do PHB foi determinada e o PHB extraído apresentou pureza entre 74,04 e 94,23% (Tabela 23).

**Tabela 25.** Pureza do PHB para o experimento com óleo residual de fritura *in natura*

Experimento	Replicata	Tempo (h)	Concentração		% Pureza
			teste de PHB ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Absorbância 235 nm	
1	1	24	5,00	0,680	91,54
2	1	48	5,00	0,550	74,04
3	1	72	5,00	0,700	94,23
4	1	96	5,00	0,690	92,89
5	2	24	5,00	0,680	91,54
6	2	48	5,00	0,550	74,04
7	2	72	5,00	0,690	92,89
8	2	96	5,00	0,690	92,89

## 5.4. MANIPUEIRA

### 5.4.1. Manipueira em diferentes concentrações

O estudo da Análise de Variância (ANOVA) para a manipueira em diferentes concentrações como fonte de carbono no crescimento celular revelou que apenas a variável concentração de manipueira foi significativa estatisticamente ( $p < 0,05$ ), enquanto o fator tempo não influenciou a biomassa (Tabela 24), assim como observado para a vinhaça. Com a metodologia de superfície de resposta observou-se que a biomassa máxima ( $1,25 \text{ g L}^{-1}$ ) foi favorecida pela concentração de manipueira na faixa de  $45\text{-}55 \text{ g L}^{-1}$ , já o tempo de incubação não influenciou a produção de biomassa (Figura 23 e Figura 24).

**Tabela 26.** Planejamento experimental fatorial fracionado  $3^{(2-0)}$  para a manipueira em diferentes concentrações e diferentes tempos de incubação utilizado no estudo da biomassa, alginato e PHB com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ( $\rho < 0,05$ )

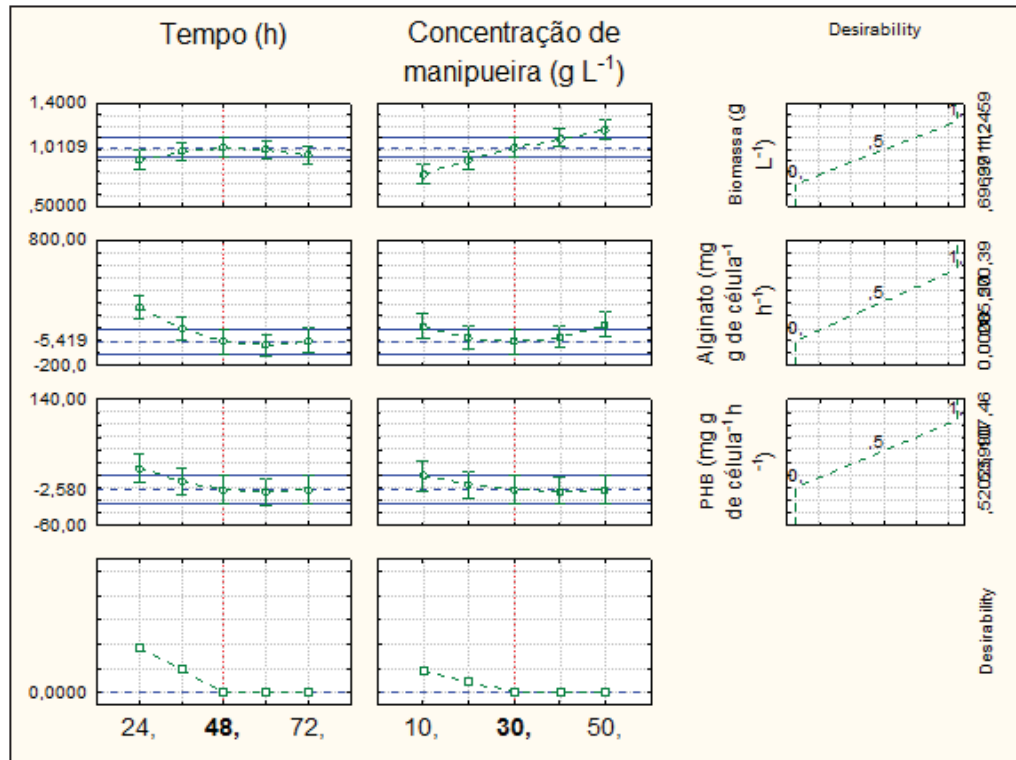
Experimento	Replicata	X1 Concentração de manipueira (g L <sup>-1</sup> )	X2 Tempo (h)	Biomassa	Alginato	PHB
				(g L <sup>-1</sup> ) * $\rho = X1$	(mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) * $\rho = X1; X2; X1*X2$	(mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) * $\rho = X1; X2; X1*X2$
1	1	10,00	24	0,70	364,26	58,04
2	1	30,00	24	0,80	275,27	23,37
3	1	50,00	24	1,09	570,39	22,96
4	1	10,00	48	0,73	181,31	4,65
5	1	30,00	48	1,03	73,07	8,59
6	1	50,00	48	1,25	57,99	4,28
7	1	10,00	72	0,74	128,44	2,82
8	1	30,00	72	0,85	0,00	5,78
9	1	50,00	72	1,17	74,81	5,32
10	2	10,00	24	0,70	361,15	107,46
11	2	30,00	24	0,96	179,06	7,34
12	2	50,00	24	1,07	369,74	12,18
13	2	10,00	48	0,77	154,53	4,96
14	2	30,00	48	1,03	7,75	1,61
15	2	50,00	48	1,12	6,42	2,82
16	2	10,00	72	0,75	72,80	0,52
17	2	30,00	72	1,06	0,00	4,63
18	2	50,00	72	0,98	269,21	3,82

\*  $\rho =$  variável independente significativa estatisticamente ( $\rho < 0,05$ ).

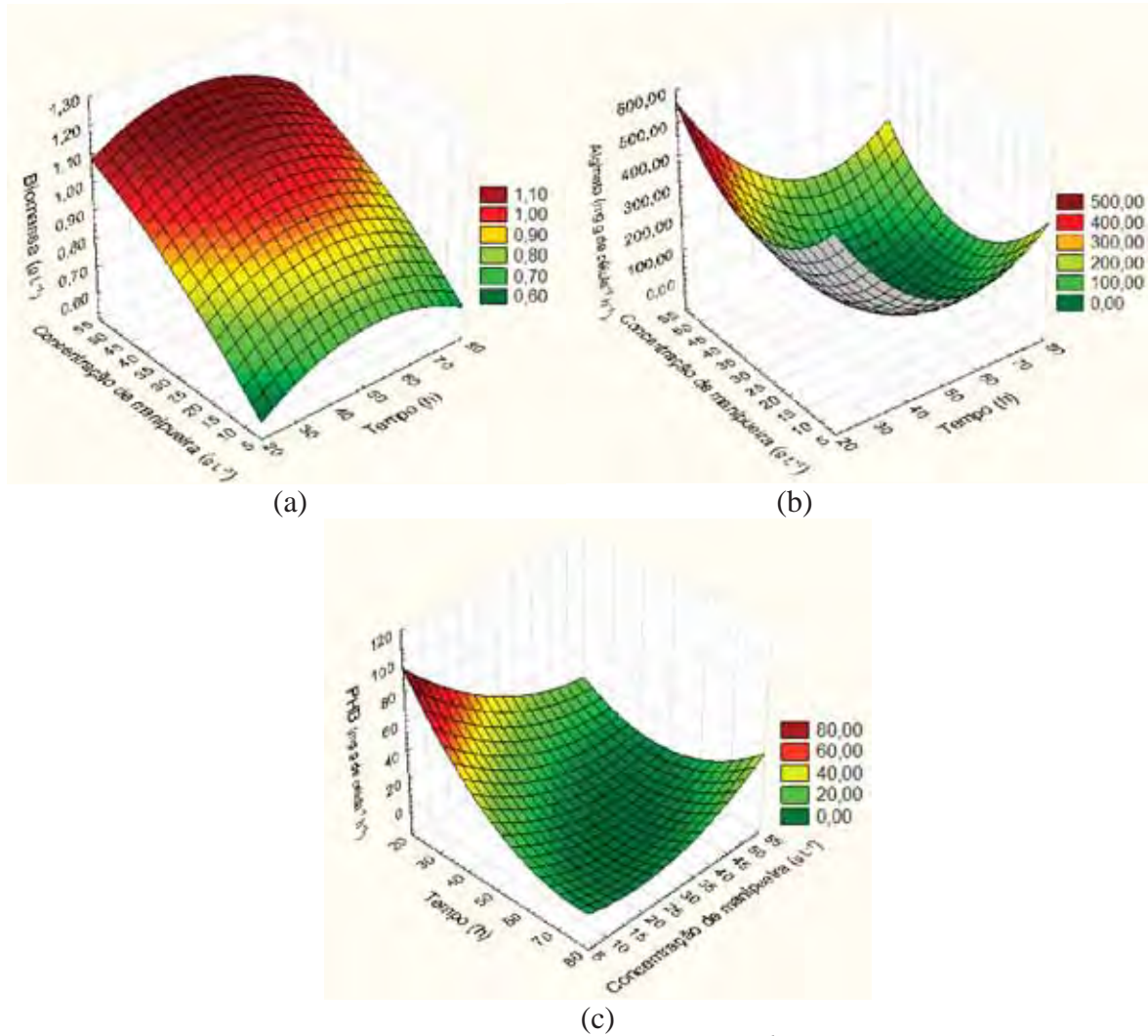
A produtividade de alginato foi máxima (570,39 mg g de célula<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) entre 20-30 h de incubação e na concentração de manipueira na faixa de 50-55 g L<sup>-1</sup>, semelhante à melhor faixa de concentração para a biomassa e o mesmo foi observado no estudo da vinhaça em diferentes concentrações (Figura 23 e Figura 24). Com o estudo da Análise de Variância (ANOVA) notou-se que todas as variáveis foram significativas estatisticamente, assim como a interação tempo de incubação e concentração de manipueira. Não há relatos na literatura de produção de alginato utilizando a manipueira como fonte de carbono.

Para a produtividade de PHB o estudo da Análise de Variância (ANOVA) revelou que todas as variáveis foram significativas estatisticamente, assim como a interação tempo de incubação e concentração de manipueira. A metodologia de superfície de resposta mostrou que a produtividade máxima de PHB foi de 90 mg g de célula<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, a concentração de manipueira ideal foi entre 5-10 g L<sup>-1</sup>, enquanto a melhor faixa para o tempo de incubação foi entre 20-30 h (Figura 23 e Figura 24). No trabalho de Costa e colaboradores (2009) a manipueira e uma mistura de manipueira adicionada de óleo residual de fritura foram utilizadas como fonte de carbono para a produção de ramnolipídeos e poli-hidroxicanoatos por *Pseudomonas aeruginosa*. Verificou-se que somente com a manipueira como fonte de

carbono a produção de ramnolipídeos foi de 300,3 mg L<sup>-1</sup> e PHA de 17,6% da massa celular seca, enquanto que a mistura de manipueira adicionada de óleo residual de fritura a produção de ramnolipídeos foi de 609,1 mg L<sup>-1</sup> e PHA de 39% da massa celular seca.



**Figura 23.** Perfil para predição de valores e desejabilidade (“Profiles for predicted values and desirability”) do planejamento experimental  $3^{(2-0)}$  para manipueira em diferentes concentrações.



**Figura 24.** Superfícies de resposta para: (a) biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação ( $h$ ) e concentração de manipueira ( $\text{g L}^{-1}$ ) (equação:  $0,24+0,015*x+0,016*y-0,0001*x*x-2,66E-5*x*y-8,52E-5*y*y$ ); (b) concentração de alginato ( $\text{mg g de célula}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação ( $h$ ) e concentração de manipueira ( $\text{g L}^{-1}$ ) (equação:  $1075,84-28,56*x-18,00*y+0,25*x*x-0,019*x*y+0,32*y*y$ ); (c) concentração de PHB ( $\text{mg g de célula}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação ( $h$ ) e concentração de manipueira ( $\text{g L}^{-1}$ ) (equação:  $189,76-4,58*x-3,82*y+0,029*x*x+0,036*x*y+0,027*y*y$ ).

A pureza do PHB foi determinada entre 70,41 e 95,85% (Tabela 25).

**Tabela 27.** Pureza do PHB para o experimento  $3^{(2-0)}$  para manipueira em diferentes concentrações

Experimento	Replicata	PHB (mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) ρ = X1; X2; X1*X2	Concentração teste de PHB (µg mL <sup>-1</sup> )	Absorbância 235 nm	Concentração determinada (µg mL <sup>-1</sup> )	% Pureza
1	1	58,04	5,00	0,568	3,82	76,46
2	1	23,37	5,00	0,568	3,82	76,46
3	1	22,96	5,00	0,679	4,57	91,41
4	1	4,65	5,00	0,666	4,48	89,66
5	1	8,59	5,00	0,569	3,83	76,60
6	1	4,28	5,00	0,700	4,71	94,23
7	1	2,82	5,00	0,689	4,63	92,75
8	1	5,78	5,00	0,523	3,52	70,41
9	1	5,32	5,00	0,687	4,62	92,48
10	2	107,46	5,00	0,613	4,12	82,52
11	2	7,34	5,00	0,599	4,03	80,64
12	2	12,18	5,00	0,687	4,62	92,48
13	2	4,96	5,00	0,654	4,40	88,04
14	2	1,61	5,00	0,689	4,63	92,75
15	2	2,82	5,00	0,623	4,19	83,87
16	2	0,52	5,00	0,642	4,32	86,43
17	2	4,63	5,00	0,712	4,79	95,85
18	2	3,82	5,00	0,544	3,66	73,23

#### 5.4.2. Manipueira *in natura*

Realizou-se um experimento em duplicata para manipueira na concentração *in natura* nos tempos de incubação 24; 48; 72 e 96 h (Tabela 26 e 27, Figura 25). Observou-se que a maior concentração de biomassa (0,53 g L<sup>-1</sup>) foi em 96 h de fermentação, assim como observado para o estudo da vinhaça *in natura* e óleo residual de fritura *in natura*. Já a máxima produtividade de alginato foi de 2109,22 mg g de célula<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> em 48 h de fermentação, assim como para o estudo da vinhaça *in natura*. A máxima produtividade de PHB (292,65 mg g de célula<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) foi no menor tempo estudado, 24 h, como ocorreu com o estudo do óleo residual de fritura *in natura*.

**Tabela 28.** Experimento para a manipueira *in natura* em diferentes tempos de incubação utilizado no estudo da biomassa, alginato e PHB

Experimento	Replicata	Tempo (h)	Biomassa (g L <sup>-1</sup> )	Alginato (mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	PHB (mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
1	1	24	0,49	970,29	300,71
2	1	48	0,55	2097,12	14,70
3	1	72	0,60	134,28	14,77
4	1	96	0,49	22,17	0,00
5	2	24	0,46	1030,05	284,59
6	2	48	0,35	2121,31	17,27
7	2	72	0,44	124,17	12,02

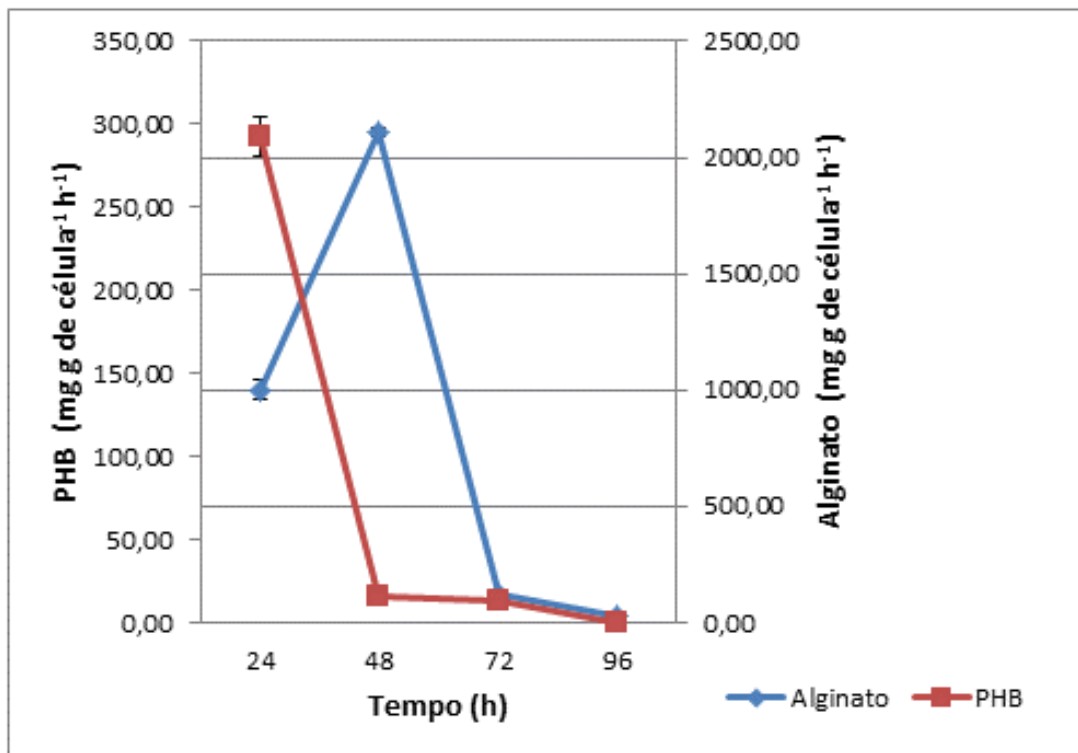


*Continuação da Tabela 29. Experimento para a manipueira in natura em diferentes tempos de incubação utilizado no estudo da biomassa, alginato e PHB*

8	2	96	0,56	34,78	0,00
---	---	----	------	-------	------

*Tabela 30. Experimento para a manipueira in natura e os valores da média e desvio padrão para biomassa, alginato e PHB nos diferentes tempos de incubação*

Tempo (h)	Biomassa (g L <sup>-1</sup> )	Alginato (mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	PHB (mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
	0,48 <sup>±</sup> /.	1000,15 <sup>±</sup> /.	292,65 <sup>±</sup> /.
24	0,022	42,29	11,40
	0,45 <sup>±</sup> /.	2109,22 <sup>±</sup> /.	15,98 <sup>±</sup> /.
48	0,14	17,10	1,82
	0,52 <sup>±</sup> /.	129,22 <sup>±</sup> /.	13,40 <sup>±</sup> /.
72	0,12	7,15	1,94
	0,53 <sup>±</sup> /.	28,48 <sup>±</sup> /.	0,00 <sup>±</sup> /.
96	0,054	8,92	0,00



*Figura 25. Experimento com manipueira in natura contendo os valores de alginato e*

*poli-hidroxibutirato em função do tempo de incubação. O valor médio de biomassa, considerando todos os tempos de incubação, foi de  $0,49 \pm 0,083 \text{ g L}^{-1}$ .*

Comparando ambos os estudos realizados, com a manipueira em diferentes concentrações e a manipueira *in natura*, observa-se que os resultados máximos de produtividade de alginato e PHB foram mais elevados quando utilizou-se a manipueira *in natura*. Este fato pode estar relacionado com dois aspectos: a manipueira *in natura* apresentava uma concentração de açúcares totais inicial de  $25,86 \text{ g L}^{-1}$ , sendo uma concentração de trabalho boa, visto que a faixa de trabalho se encontra na maioria dos estudos entre  $10$  e  $50 \text{ g L}^{-1}$ ; outro aspecto importante foi o fato da manipueira *in natura* não passar pelo processo de aquecimento/fervura para evaporação da água e conseqüente concentração dos açúcares presentes no meio (procedimento utilizado para alcançar as concentrações utilizadas no estudo da manipueira em diferentes concentrações). O processo de aquecimento/fervura altera a composição do resíduo, fato que pode ter resultado em uma menor para produção de alginato e PHB, quando comparado com o resíduo *in natura*.

O PHB extraído apresentou pureza entre 78,08 e 98,27% (Tabela 28).

**Tabela 31.** Pureza do PHB para o experimento com manipueira *in natura*

Experimento	Replicata	Tempo (h)	Concentração teste de PHB ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Absorbância 235 nm	Concentração determinada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% Pureza
1	1	24	5,00	0,590	3,97	79,43
2	1	48	5,00	0,710	4,77	95,58
3	1	72	5,00	0,730	4,91	98,27
4	1	96	-	-	-	-
5	2	24	5,00	0,580	3,90	78,08
6	2	48	5,00	0,700	4,71	94,23
7	2	72	5,00	0,720	4,84	96,93
8	2	96	-	-	-	-

## 5.5. ÁGUA RESIDUAL DA INDÚSTRIA DE REFRIGERANTES

### 5.5.1. Água Residual da Indústria de Refrigerantes em diferentes concentrações

O planejamento experimental com a água residual da indústria de refrigerantes, mostrou por meio do estudo da Análise de Variância (ANOVA) que ambas as variáveis concentração de água residual da indústria de refrigerantes e tempo de incubação foram significativas estatisticamente ( $\rho < 0,05$ ) para a biomassa (Tabela 29). Com a metodologia de superfície de resposta observou-se que a biomassa máxima ( $1,10 \text{ g L}^{-1}$ ) foi favorecida pela concentração de água residual da indústria de refrigerantes na faixa de  $0,10\text{-}0,70 \text{ g L}^{-1}$  na faixa de tempo de incubação entre  $20\text{-}50 \text{ h}$  (Figura 26 e Figura 27). Durante os experimentos não foi observado nenhuma produção de alginato.

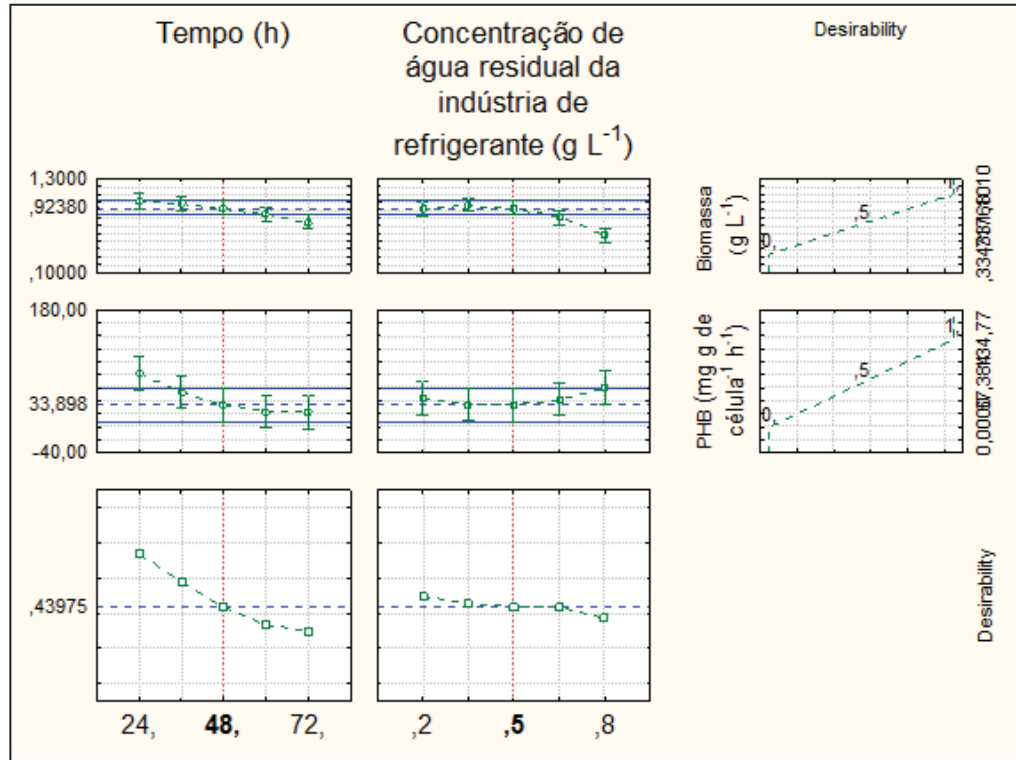
O estudo da Análise de Variância (ANOVA) para a produtividade de PHB mostrou que nenhuma variável analisada foi significativa estatisticamente. A metodologia de superfície de resposta mostrou que a produtividade máxima de PHB foi de  $134,77 \text{ mg g de célula}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , sendo a concentração de água residual da indústria de refrigerantes ideal entre  $0,80\text{-}0,90 \text{ g L}^{-1}$ , enquanto a melhor faixa para o tempo de incubação foi entre  $20\text{-}30 \text{ h}$ , este último também observado para o estudo da manipueira em diferentes concentrações (Figura 26 e Figura 27). Na literatura não há estudos de produção de biomoléculas utilizando a água residual da indústria de refrigerantes.

**Tabela 32.** Planejamento experimental fatorial fracionado  $3^{(2-0)}$  para a água residual da indústria de refrigerantes em diferentes concentrações e diferentes tempos de incubação utilizado no estudo da biomassa, alginato e PHB com as respectivas variáveis independentes significativas estatisticamente ( $\rho < 0,05$ )

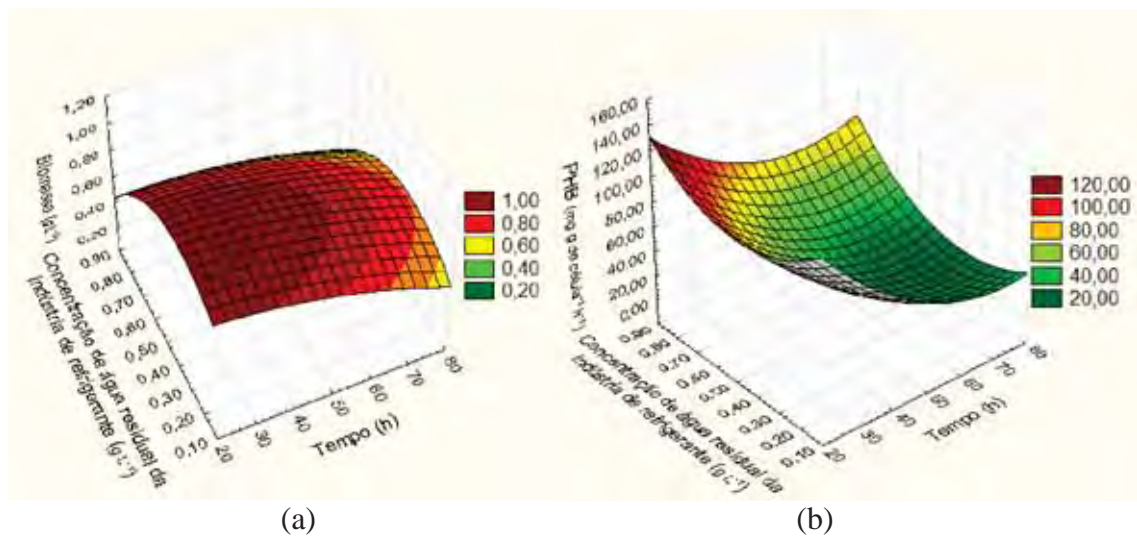
Experimento	Replicata	X1 Concentração de água residual da indústria de refrigerante ( $\text{g L}^{-1}$ )	X2 Tempo (h)	Biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) * $\rho = \text{X1}; \text{X2}$	Alginato ( $\text{mg g de célula}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) * $\rho = \text{sem resultados}$	PHB ( $\text{mg g de célula}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) * $\rho = \text{nenhum}$
1	1	0,20	24	0,99	0,00	92,92
2	1	0,50	24	1,10	0,00	98,24
3	1	0,80	24	0,64	0,00	56,68
4	1	0,20	48	0,88	0,00	43,44
5	1	0,50	48	0,88	0,00	45,67
6	1	0,80	48	0,51	0,00	84,92
7	1	0,20	72	0,69	0,00	38,65
8	1	0,50	72	0,63	0,00	37,51
9	1	0,80	72	0,48	0,00	55,45
10	2	0,20	24	1,04	0,00	95,21
11	2	0,50	24	1,00	0,00	96,87
12	2	0,80	24	0,55	0,00	134,77
13	2	0,20	48	0,88	0,00	49,03
14	2	0,50	48	0,93	0,00	0,00

15	2	0,80	48	0,73	0,00	55,05
16	2	0,20	72	0,78	0,00	20,51
17	2	0,50	72	0,82	0,00	0,00
18	2	0,80	72	0,33	0,00	54,09

\*  $\rho$  = variável independente significativa estatisticamente ( $\rho < 0,05$ ).



**Figura 26.** Perfil para predição de valores e desejabilidade (“Profiles for predicted values and desirability”) do planejamento experimental  $3^{(2-0)}$  para água residual da indústria de refrigerantes em diferentes concentrações.



**Figura 27.** Superfícies de resposta para: (a) biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e concentração de água residual da indústria de refrigerante ( $\text{g L}^{-1}$ ) (equação:  $0,85+0,0007*x+1,31*y-8,20E-5*x*x+0,0033*x*y-2,03*y*y$ ); (b) concentração de PHB ( $\text{mg g de célula}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) ao redor dos valores ótimos de tempo de incubação (h) e

concentração de água residual da indústria de refrigerante ( $\text{g L}^{-1}$ ) (equação:  $227,66-4,81*x-218,67*y+0,032*x*x+0,82*x*y+207,55*y*y$ ). Não houve produção de alginato.

A pureza do PHB foi determinada entre 67,18 e 95,58 (Tabela 30).

**Tabela 33.** Pureza do PHB para o experimento  $3^{(2-0)}$  para água residual da indústria de refrigerante em diferentes concentrações

Experimento	Replicata	PHB (mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) ρ = nenhum	Concentração teste de PHB ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Absorbância 235 nm	Concentração determinada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% Pureza
1	1	92,92	5,00	0,612	4,12	82,39
2	1	98,24	5,00	0,653	4,39	87,91
3	1	56,68	5,00	0,559	3,76	75,25
4	1	43,44	5,00	0,543	3,65	73,10
5	1	45,67	5,00	0,698	4,69	93,97
6	1	84,92	5,00	0,578	3,89	77,81
7	1	38,65	5,00	0,600	4,03	80,77
8	1	37,51	5,00	0,710	4,77	95,58
9	1	55,45	5,00	0,543	3,65	73,10
10	2	95,21	5,00	0,556	3,74	74,85
11	2	96,87	5,00	0,563	3,79	75,79
12	2	134,77	5,00	0,499	3,36	67,18
13	2	49,03	5,00	0,642	4,32	86,43
14	2	0,00	-	-	-	-
15	2	55,05	5,00	0,578	3,89	77,81
16	2	20,51	5,00	0,656	4,41	88,31
17	2	0,00	-	-	-	-
18	2	54,09	5,00	0,680	4,57	91,54

### 5.5.2. Água residual da indústria de refrigerantes *in natura*

Realizou-se um experimento em duplicata para água residual da indústria de refrigerantes na concentração *in natura* nos tempos de incubação 24; 48; 72 e 96 h. Observou-se que não houve diferença significativa na concentração de biomassa entre os tempos de incubação analisados, sendo a média e o desvio padrão de  $0,36 \pm 0,026 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 31 e 32, Figura 28).

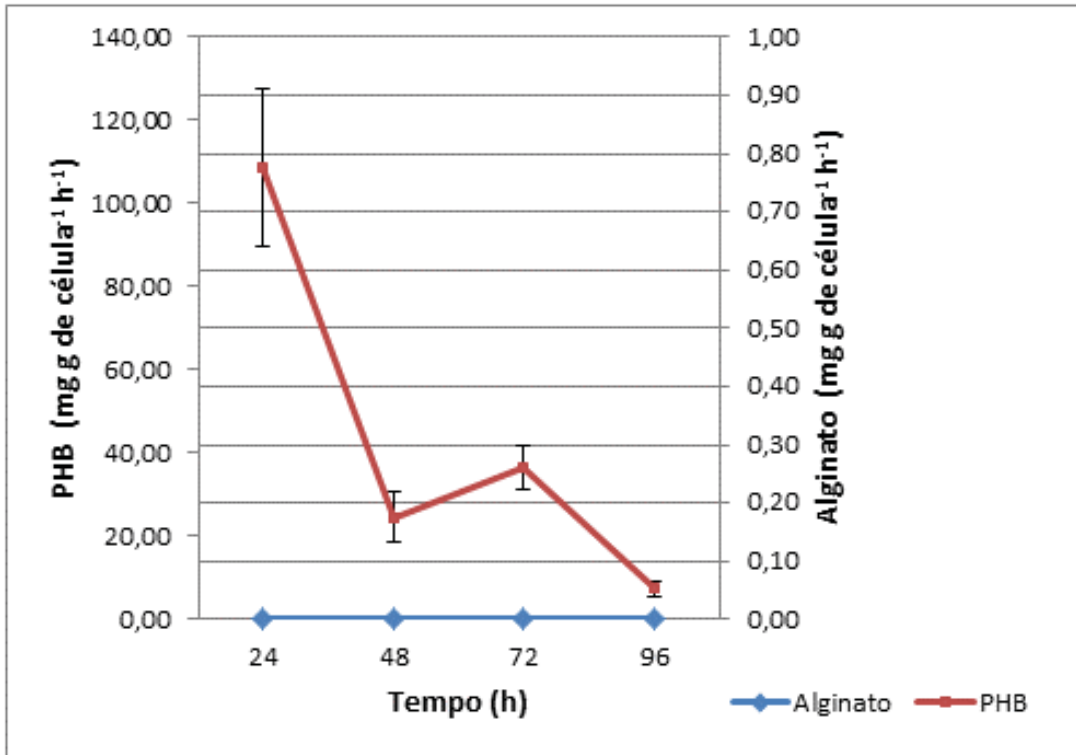
Assim como para o estudo da água residual da indústria de refrigerante em diferentes concentrações não houve produção de alginato. A máxima produtividade de PHB ( $108,66 \text{ mg g de célula}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) foi no menor tempo estudado, 24 h, assim como ocorreu com o estudo do óleo residual de fritura e manipueira *in natura*.

**Tabela 34.** Experimento para a água residual da indústria de refrigerante in natura em diferentes tempos de incubação utilizado no estudo da biomassa, alginato e PHB

Experimento	Replicata	Tempo (h)	Biomassa (g L <sup>-1</sup> )	Alginato (mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	PHB (mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
1	1	24	0,33	0,00	95,38
2	1	48	0,39	0,00	28,92
3	1	72	0,36	0,00	32,55
4	1	96	0,39	0,00	8,85
5	2	24	0,36	0,00	121,95
6	2	48	0,35	0,00	20,34
7	2	72	0,31	0,00	40,05
8	2	96	0,37	0,00	6,24

**Tabela 35.** Experimento para a água residual da indústria de refrigerante in natura e os valores da média e desvio padrão para biomassa, alginato e PHB nos diferentes tempos de incubação

Tempo (h)	Biomassa (g L <sup>-1</sup> )	Alginato (mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	PHB (mg g de célula <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
24	0,35 <sup>+/-</sup> 0,022	0,00 <sup>+/-</sup> 0,00	108,66 <sup>+/-</sup> 18,79
48	0,37 <sup>+/-</sup> 0,030	0,00 <sup>+/-</sup> 0,00	24,63 <sup>+/-</sup> 6,07
72	0,34 <sup>+/-</sup> 0,037	0,00 <sup>+/-</sup> 0,00	36,30 <sup>+/-</sup> 5,30
96	0,38 <sup>+/-</sup> 0,015	0,00 <sup>+/-</sup> 0,00	7,54 <sup>+/-</sup> 1,84



**Figura 28.** Experimento com água residual da indústria de refrigerante *in natura* contendo os valores de alginato e poli-hidroxibutirato em função do tempo de incubação. O valor médio de biomassa, considerando todos os tempos de incubação, foi de  $0,36 \pm 0,026 \text{ g L}^{-1}$ .

Comparando ambos os estudos realizados, com a água residual da indústria de refrigerantes em diferentes concentrações e a água residual da indústria de refrigerantes *in natura*, observa-se que os resultados máximos de produção de biomassa e PHB foram mais elevados quando se utilizou a água residual da indústria de refrigerantes em diferentes concentrações. Este fato está relacionado com a baixa concentração de açúcares totais na amostra *in natura* ( $1,00 \text{ g L}^{-1}$ ), mas ainda assim a produtividade do PHB ( $108,66 \text{ mg g de célula}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) foi maior que a obtida com a vinhaça *in natura* ( $\text{PHB} = 32,04 \text{ mg g de célula}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), cuja concentração de açúcares totais correspondia a  $7,66 \text{ g L}^{-1}$ .

A pureza do PHB foi determinada entre 78,08 e 96,93 (Tabela 33).

**Tabela 36.** Pureza do PHB para o experimento com água residual da indústria de refrigerante *in natura*

Experimento	Replicata	Tempo (h)	Concentração		% Pureza
			teste de PHB ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Absorbância 235 nm	
1	1	24	5,00	0,660	88,85
2	1	48	5,00	0,610	82,12
3	1	72	5,00	0,720	96,93
4	1	96	5,00	0,580	78,08
5	2	24	5,00	0,670	90,20
6	2	48	5,00	0,620	83,46
7	2	72	5,00	0,710	95,58
8	2	96	5,00	0,590	79,43



## 6. CONCLUSÕES

Em geral, o tempo de incubação não influenciou expressivamente o crescimento bacteriano e tampouco a fonte de carbono.

Os valores de biomassa para vinhaça, óleo residual de fritura, manipueira e água residual da indústria de refrigerantes, todos em diferentes concentrações, ficaram entre (1,10 – 1,80 g L<sup>-1</sup>). Com exceção para a glicerina, em diferentes concentrações, cujo aumento da biomassa (3,34 g L<sup>-1</sup>) foi acompanhado pelo acréscimo no tempo de incubação 80 h. Já os substratos in natura tiveram valores de biomassa entre 0,019 e 1,48 g L<sup>-1</sup>.

A melhor produção de alginato foi obtida com a manipueira in natura (2109,22 mg g de célula<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) em 48 h de fermentação e com a vinhaça (1000,00 mg g de célula<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), sendo a concentração ideal deste resíduo na faixa de 15-40 g L<sup>-1</sup>. Não houve produção de alginato com a glicerina in natura e tampouco com a água residual da indústria de refrigerantes tanto in natura quanto em diferentes concentrações.

Nos menores tempos de incubação (20-48 h) ocorreram as maiores produtividades específicas de poli-hidroxibutirato, sendo a manipueira in natura responsável pela maior produtividade específica (292,65 mg g de célula<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) em 24 h de incubação.

Com este trabalho pode-se concluir que entre as fontes de carbono alternativas utilizadas a manipueira in natura foi o substrato ideal para produção de alginato e poli-hidroxibutirato pela bactéria *Azotobacter vinelandii* CCT 2481, com a vantagem de obter altas concentrações destes polímeros utilizando um tempo de incubação de apenas 24 e 48 h. O trabalho mostrou, de forma inédita, a possibilidade de elevadas produtividades de alginato com a manipueira in natura, sendo uma alternativa de agregação comercial a este resíduo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, M. G. E.; EIROA, M.; TORRES, C., NUNES, B. R.; REIS, M. A. M. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 130, n. 4, p. 411-421, 2007.

ALI, A. Q.; KANNAN, T. P.; AHMAD, A.; SAMSUDIN, A. R. *In vitro* genotoxicity tests for polyhydroxybutyrate – A synthetic biomaterial. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 22, n. 1, p. 57-67, 2008.

ALKAWASH, M. A.; SOOTHILL, J. S.; SCHILLER, N. L. Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. **APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Kobenhavn, v. 114, n. 2, p. 131-138, 2006.

ALLMAN, R.; HANN, A. C.; PHILLIPS, A. P.; MARTIN, K. L.; LLOYDE, D. Growth of *Azotobacter vinelandii* with correlation of Coulter size flow cytometric parameters, and ultrastructure. **Cytometry**, New York, v.11, p. 822-831, 1990.

ALMEIDA, A.; RUIZ, J. A.; LÓPEZ, N. I.; PETTINARI, M. J. Bioplásticos - una alternativa ecológica. **Revista Química Viva**, Buenos Aires, n. 3, p. 122-133, 2004.

ARAÚJO, D. G. **Produção de poli [3-hidroxitirato-co-3-hidroxitirato] por *Escherichia coli* recombinante a partir de glicose e ácido propiônico.** 2005. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 2005.

AVANCINI, S. R. P.; FACCIN, G. L.; VIEIRA, M. A.; ROVARIS, A. A.; PODESTÁ, R.; TRAMONTE, R.; SOUZA, N. M. A.; AMANTE, E. R. Cassava starch fermentation wastewater: Characterization and preliminary toxicological studies. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 11, p. 2273–2278, 2007.

BARANA, A. C.; CEREDA, M. P. Tratamento de água residual do processamento de mandioca (manipueira) utilizando biodigestor anaeróbio de duas fases. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 183-186, 2000.

BARBOSA, C. R. **Avaliação do glicerol proveniente da fabricação do biodiesel como substrato para produção de endotoxinas por *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis***. 2009. 135 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Universidade de São Paulo, Lorena, Brasil, 2009.

BARROCAL, V. M.; GARCÍA-CUBERO, M. T.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; COCA, M. Production of biomass by *Spirulina maxima* using sugar beet vinasse in growth media. **New Biotechnology**, Cambridge, v. 27, n. 6, p. 851-856, 2010.

BELLENGER, J. P.; WICHARD, T.; KRAEPIEL, A. M. L. Vanadium requirements and uptake kinetics in the dinitrogen-fixing bacterium *Azotobacter vinelandii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 5, p. 1478-1484, 2008.

BOOMA, M.; SELKE, S. E.; GIACIN, J. R. Degradable Plastics. **Journal of Elastomers and Plastics**, Auburn, v. 26, n. 2, p. 104-142, 1994.

BORJA, R.; BANKS, C. J. Semicontinuous anaerobic digestion of soft drink wastewater in immobilized cell bioreactors. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 15, n. 7, p. 767-772, 1993.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for Experimenters: An Introduction to Design Data Analysis and Model Building**. New York: John Wiley, 1978, p. 125–175.

BRACCINI, I.; PÉREZ, S. Molecular basis of  $\text{Ca}^{2+}$  induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. **Biomacromolecules**, Washington, v. 2, n. 4, p. 1089-1096, 2001.

BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTY, R. M. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 6, n. 1, p. 29-37, 1978.

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 65, n. 2-3, p. 127–161, 1998.

BRIVONESE, A. C.; SUTHERLAND, I. W. Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 30, n. 1, p. 97-101, 1989.

BURNS, K. L.; OLDHAM, C. D.; THOMPSON, J. R.; LUBARSKY, M.; MAY, S. W. Analysis of the *in vitro* biocatalytic production of poly-( $\beta$ )-hydroxybutyric acid. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 41, n. 5, p. 591–599, 2007.

BYROM, D. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate: poly- $\beta$ -hydroxyvalerate copolymers. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 103, n. 2-4, p. 247-250, 1992.

CAMILI, E. A.; CABELLO, C. **Produção de etanol de manipueira tratada com processo de flotação**. Revista Raízes e Amidos Tropicais (RAT). Botucatu: CERAT/UNESP, v. 3, 2007. Disponível em: <http://www.cerat.unesp.br/revistarat/volume3.php>. Acesso em: 11 de maio de 2011.

CASTELLANELLI, C. A. **Estudo da viabilidade de produção do biodiesel, obtido através do óleo de fritura usado, na cidade de Santa Maria-RS**. 2008. 112 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil, 2008.

CEREDA, M. P. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. Série culturas de tuberosas amiláceas latinoamericanas. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. 340p.

CHEN, W. P.; CHEN, J. Y.; CHANG, S. C.; SU, C. L. Bacterial alginate produced by a mutant of *Azotobacter vinelandii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 49, n. 3, p. 543-546, 1985.

CHO, K. S.; RYU, H. W.; PARK, C.; GOODRICH, P. R. Utilization of swine wastewater as a feedstock for the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 91, n. 2, p. 129-133, 2001.

CLEMENTI, F.; FANTOZZI, P.; MANCINI, F.; MORESI, M. Optimal conditions for alginate production by *Azotobacter vinelandii*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 17, n. 11, p. 983-988, 1995.

CLEMENTI, F. Alginate Production by *Azotobacter vinelandii*. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 17, n. 4, p. 327-361, 1997.

CLEMENTI, F.; CRUDELE, M. A.; PARENTE, E.; MANCINI, M.; MORESI, M. Production and characterisation of alginate from *Azotobacter vinelandii*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, n. 4, p. 602-610, 1999.

CORNELIS, P. *Pseudomonas Genomics and Molecular Biology*. Norfolk: Caister Academic Press, 2008, 244p.

COSTA, S. G. V. A. O.; LEPINE, F.; MILOT, S.; DÉZIEL, E.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 36, n. 8, p. 1063–1072, 2009.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 531-537, 2000.

CRUZ, J. G. B. D. **Utilização de reatores microbianos com células imobilizadas no tratamento de efluente de uma indústria de bebidas**. 2007. 79 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2007.

DRAGET, K. I.; SMIDSRØD, O.; SKJÅK-BRÆK, G. **Alginates from Algae**. In:\_. Polysaccharides and polyamides in the food industry. Properties, production and patents. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH&Co, 2005, p. 1-30.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

FERNANDES, B. S.; PEIXOTO, G.; ALBRECHT, F. R.; AGUILA, N. K. S.; ZAIAT, M. Potential to produce biohydrogen from various wastewaters. **Energy for Sustainable Development**, Bangalore, v. 14, n. 2, p. 143–148, 2010.

FERNÁNDEZ, D.; RODRÍGUEZ, E.; BASSAS, M.; VIÑAS, M.; SOLANAS, A. M.; LLORENS, J.; MARQUÉS, A. M.; MANRESA, A. Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 26, n. 2-3, p. 159–167, 2005.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis - uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; PAIS, J.; CARVALHEIRA, M.; COSTA, N.; OLIVEIRA, R.; REIS, M. A. M. Production of a new exopolysaccharide (EPS) by *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 grown on glycerol. **Process Biochemistry**, London, v. 45, n. 3, p. 297–305, 2010.

GACESA, P.; RUSSELL, N. J. **The structure and property of alginate**. In: \_ *Pseudomonas* infection and alginates. London: Chapman & Hall, 1990, p. 29-49.

GALDÁMEZ, E. V. C. **Aplicações das técnicas de planejamento e análise de experimentos na melhoria da qualidade de um processo de fabricação de produtos plásticos**. 2002. 133 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia da Produção) - Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil, 2002.

GAONA, G.; NUNEZ, C.; GOLDBERG, J. B.; LINFORD, A. S.; NAJERA, R.; CASTANEDA, M.; GUZMAN, J.; ESPIN, G.; SOBERON-CHAVEZ, G. Characterization of the *Azotobacter vinelandii* algC gene involved in alginate and lipopolysaccharide production. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 238, n. 1, p. 199-206, 2004.

GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U.; SILVA, A. N. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1800-1806, 2008.

GHATNEKAR, M. S.; PAI, J. S.; GANESH, M. Production and recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Methylobacterium* sp V49. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 77, n. 4, p. 444-448, 2002.

GLICKSMAN, M. Utilization of seaweed hydrocolloids in the food industry. **Hydrobiologia**, The Hague, v. 151-152, n. 1, p. 31-47, 1987.

GOMEZ, J. G. C.; BUENO-NETTO, C. L. **Produção de poliésteres bacterianos**. In: \_\_. Biotecnologia industrial - Processos Fermentativos e Enzimáticos. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, v. 3, 2001, p. 219-245.

GOVAN, J. R. W.; HARRIS, G. S. *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis - unusual bacterial adaptation and pathogenesis. **Microbiological Sciences**, Oxford, v. 3, n. 10, p. 302-308, 1986.

HABA, E.; VIDAL-MAS, J.; BASSAS, M.; ESPUNY, M. J.; LLORENS, J.; MANRESA, A. Poly 3-(hydroxyalkanoates) produced from oily substrates by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (NCBIM 40044): Effect of nutrients and incubation temperature on polymer composition. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 35, n. 2, p. 99-106, 2007.

HAHN, S. K.; CHANG, Y. K.; LEE, S. Y. Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 1, p. 34-39, 1995.

HALAMI, P. M. Production of polyhydroxyalkanoate from starch by the native isolate *Bacillus cereus* CFR06. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 805-812, 2008.

HEO, K.; YOON, J.; JIN, K. S.; JIN, S.; SATO, H.; OZAKI, Y.; SATKOWSKI, M. M.; NODA, I.; REE, M. Structural evolution in microbial polyesters. **Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 112, n. 15, p. 4571-4582, 2008.

HORAN, N. J.; JARMAN, T. R.; DAWES, E. A. Studies of some enzymes of alginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture. **Journal of General Microbiology**, London, v. 129, p. 2985-2990, 1983.

HRABAK, O. Industrial production of poly-b-hydroxybutyrate. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 103, n. 2-4, p. 251-256, 1992.

IBRAHIM, M. H.; STEINBÜCHEL, A. *Zobellella denitrificans* strain MW1, a newly isolated bacterium suitable for poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, n. 1, p. 214–225, 2010.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 100, n.3, p. 260-265, 2005.

KAEWKANNETRA, P.; CHIWES, W.; CHIU, T. Y. Treatment of cassava mill wastewater and production of electricity through microbial fuel cell technology. **Fuel**, London, v. 90, n. 8, p. 2746-2750, 2011.

KALYUZHNYI, S. V.; SAUCEDO, J. V.; MARTINEZ, J. R. The anaerobic treatment of soft drink wastewater in UASB and hybrid reactors. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 66, n. 3, p. 291-301, 1997.

KIM, B. S.; CHANG, H. N. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from starch by *Azotobacter chroococcum*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 20, n. 2, p. 109-112, 1998.



LAFFERTY, R. M.; KORSATKO, B.; KORSATKO, W. **Microbial production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid**. In: *Biotechnology*. New York: VCH Publishers, 1988, p. 135-176.

LAW, J. H.; SLEPECKY, R. A. Assay of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 82, n. 1, p. 33-36, 1961.

LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 49, n. 1, p. 1-14, 1996.

LIN, L. P.; SADOFF, H. L. Encystment and polymer production by *Azotobacter vinelandii* in the presence of  $\beta$ -hydroxybutyrate. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 95, n. 6, p. 2336-2343, 1968.

LUGG, H.; SAMMONS, R. L.; MARQUIS, P. M.; HEWITT, C. J.; YONG, P.; PATERSON-BEEDLE, M.; REDWOOD, M. D.; STAMBOULIS, A.; KASHANI, M.; JENKINS, M.; MACASKIE, L. E. Polyhydroxybutyrate accumulation by a *Serratia* sp. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 30, n. 3, p. 481-491, 2008.

MARTINSEN, A.; SKJÅK-BRÆK, G.; SMIDSRØD, O.; ZANETTI, F.; PAOLETTI, S. Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distributions of alginates. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 15, n. 2, p. 171-193, 1991.

MATOŠIĆ, M.; PRSTEC, I.; JAKOPOVIĆ, H. K.; MIJATOVIĆ, I. Treatment of beverage production wastewater by membrane bioreactor. **Desalination**, Amsterdam, v. 246, n. 1-3, p. 285-293, 2009.

MAY, T. B.; CHAKRABARTY, A. M. *Pseudomonas aeruginosa*: genes and enzymes of alginate synthesis. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 2, n. 5, p. 151-157, 1994.

MISRA, S. K.; NAZHAT, S. N.; VALAPPIL, S. P.; MOSHREFI-TORBATI, M.; WOOD, R. J. K.; ROY, I.; BOCCACCINI, A. R. Fabrication and characterization of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate) composite containing bioglass. **Biomacromolecules**, Washington, v. 8, n. 7, p. 2112-2119, 2007.

MOEN, E.; LARSEN, B.; OSTGAARD, K.; JENSEN, A. Alginate stability during high salt preservation of *Ascophyllum nodosum*. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 11, n.1, p. 21–25, 1999.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. New York: John Wiley & Sons, 2001.

MOTHES, G.; SCHNORPFEIL, C.; ACKERMANN, J. U. Production of PHB from Crude Glycerol. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v. 7, n. 5, p. 475–479, 2007.

MOURA, R. B.; TERAN, F. J. C. Study of a sequencing batch reactor treating wastewater from na industry of soft drinks. **HOLOS Environment**, Rio Claro, v. 9, n. 2, p. 274-288, 2009.

MYSHKINA, V. L.; NIKOLAEVA, D. A.; MAKHINA, T. K.; BONARTSEV, A. P.; BONARTSEVA, G. A. Effect of Growth Conditions on the Molecular Weight of Poly-3-hydroxybutyrate Produced by *Azotobacter chroococcum* 7B. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 44, n. 5, p. 482–486, 2008.

NASU, E. G. C. **Composição química da manipueira e sua potencialidade no controle de *Meloidogyne incognita* em tomateiro no oeste do paraná.** 2008. 74 f. Disserta o (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste Paulista, Marechal Cândido Rondon, Brasil, 2008.

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method for determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 153, p. 375-380, 1944.

NITAYAVARDHANA, S.; KHANAL, S. K. Innovative biorefinery concept for sugar-based ethanol industries: Production of protein-rich fungal biomass on vinasse as an aquaculture feed ingredient. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 23, p. 9078–9085, 2010.

OKTAY, S.; ISKENDER, G.; BABUNA, F. G.; KUTLUAY, G.; ORHON, D. Improving the wastewater management for a beverage industry with in-plant control. **Desalination**, Amsterdam, v. 211, n. 1-3, p. 138–143, 2007.

OLIVEIRA, B. G. **Vinhaça da cana-de-açúcar: fluxos de gases de efeito estufa e comunidades *archaea* presente no sedimento do canal de distribuição.** 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba, Brasil, 2010.

PAGE, W. J.; KNOSP, O. Hyperproduction of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 6, p. 1334-1339, 1989.

PAGE, W. J.; MANCHAK, J.; RUDY, B. Formation of poly-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 9, p. 2866-2873, 1992.

PAGE, W. J.; CORNISH, A. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 12, p. 4236-4244, 1993.

PAGE, W. J.; TINDALE, A.; CHANDRA, M.; KWON, E. Alginate formation in *Azotobacter vinelandii* UWD during stationary phase and the turnover of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. **Microbiology**, Reading, v. 147, n. 2, p. 483-490, 2001.

PAULINO, A. F.; MEDINA, C. C.; ROBAINA, C. R. P.; LAURANI, R. A. Produções agrícola e industrial de cana-de-açúcar submetida a doses de vinhaça. **Semina. Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 145-150, 2002.

PEÑA, C.; CAMPOS, N.; GALINDO, E. Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 48, n. 4, p. 510-515, 1997.

PORTAL DO AGRONEGÓCIO. Mandioca, a raiz do Brasil. Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=23625>. Acesso em: 11 de maio de 2011.

POSADA, J. A.; NARANJO, J. M.; LÓPEZ, J. A.; HIGUITA, J. C.; CARDONA, C. A. Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. **Process Biochemistry**, London, v. 46, n. 1, p. 310–317, 2011.

POUTON, C. W.; AKHATAR, S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p. 133-162, 1996.

PRADA, S. M.; GUEKEZIAN, M.; SUÁREZ-IHA, M. E. Metodologia analítica para a determinação de sulfato em vinhoto. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 249-252, 1998.

PUNRATTANASIN, W. **The utilization of activated sludge polyhydroxyalkanoates for the production of biodegradable plastics**. 2001. 131 f. Tese (Doutorado em Filosofia em Ciência Ambiental e Engenharia) - Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, EUA, 2001.

QUAGLIANO, J. C.; AMARILLA, F.; FERNANDES, E. G.; MATA, D.; MIYAZAKI, S. S. Effect of simple and complex carbon sources, low temperature culture and complex carbon feeding policies on poly-3-hydroxybutyric acid (PHB) content and molecular weight (Mw) from *Azotobacter chroococcum* 6B. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 17, n. 1, p. 9-14, 2001.

QUILLAGUAMÁN, J.; DOAN-VAN, T.; GUZMÁN, H.; GUZMÁN, D.; MARTÍN, J.; EVEREST, A.; HATTI-KAUL, R. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* in fed-batch culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 78, n. 2, p. 227-232, 2008.

REDIERS, H.; VANDERLEYDEN, J.; DE MOT, R. *Azotobacter vinelandii*: Pseudomonas in disguise?. **Microbiology Comment**, Reading, v. 150, p. 1117-1119, 2004.

RIBAS, M. M. F. **Tratamento de vinhaça em reator anaeróbico operado em batelada seqüencial contendo biomassa imobilizada sob condições termofílicas e mesofílicas**. 2006. 198 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil, 2006.

RIVALDI, J. D.; SARROUB, B. F.; FIORILO, R.; SILVA, S. S. Glicerol de biodiesel. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 37, p. 44-51, 2007/2008.

SABRA, W.; ZENG, A. P.; DECKWER, W. D. Bacterial Alginate - physiology, product quality and process aspects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, n. 3-4, p. 315-325, 2001.

SADOFF, H. L. Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v. 39, n. 4, p. 516–539, 1975.

SANTOS, A. P. B.; PINTO, A. C. Biodiesel: uma alternativa de combustível limpo. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 58-62, 2009.

SANTOS, M. S. e RIBEIRO, F. M. Cervejas e refrigerantes. São Paulo: CETESB, 2005, 58p.

SAVALGI, V.; SAVALGI, V. Alginate production by *Azotobacter vinelandii* in batch culture. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 38, n. 6, p. 641-645, 1992.

SEGATO, M. P. **Estudos termoanalíticos do ácido algínico e dos alginatos de metais alcalinos, alcalino-terrosos, amônio, mono-, di- e trietanolamônio**. 2007. 112 f . Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil, 2007.

SEGURA, D.; CRUZ, T.; ESPIN, G. Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly-beta-hydroxybutyrate synthesis. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 179, n. 6, p. 437-443, 2003.

SETUBAL, J. C.; SANTOS, P.; GOLDMAN, B. S.; ERTESVÅG, H.; ESPIN, G.; RUBIO, L. M.; VALLA, S.; ALMEIDA, N. F.; BALASUBRAMANIA, D.; CROMES, L.; CURATTI, L.; DU, Z.; GODSY, E.; GOODNER, B.; HELLNER-BURRIS, K.; HERNANDES, J. A.; HOUMIEL, K.; IMPERIAL, J.; KENNEDY, C.; LARSON, T. J.; LATREILLE, P.; LIGON, L. S.; LU, J.; MAERK, M.; MILLER, N. M.; NORTON, S.; O'CARROLL, I. P.; PAULSEN, I.; RAULFS, E. C.; ROEMER, R.; ROSER, J.; SEGURA, D.; SLATER, S.; STRICKLIN, S.

L.; STUDHOLME, D. J.; SUN, J.; VIANA, C. J.; WALLIN, E.; WANG, B.; WHEELER, C.; ZHU, H.; DEAN, D. R.; DIXON, R.; WOOD, D. Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 191, n. 14, p. 4534–4545, 2009.

SHISHATSKAYA, E. I.; VOINOVA, O. N.; GOREVA, A. V.; MOGILNAYA, O. A.; VOLOVA, T. G. Biocompatibility of polyhydroxybutyrate microspheres: in vitro and in vivo evaluation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, London, v. 19, n. 6, p. 2493-2502, 2008.

SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 11, n. 1, p. 108–114, 2007.

SILVA, A. N. **Produção otimizada de alginato e plástico biodegradável (poli-hidroxibutirato) por *Azotobacter vinelandii***. 2009. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, Brasil, 2009.

SILVA, C. L. S. **Glicerina proveniente da produção de biodiesel como ingrediente de ração para frangos de corte**. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba, Brasil, 2010.

SILVA, A. N.; GARCIA-CRUZ, C. H. A metodologia de superfície de resposta como ferramenta para a avaliação da produção de alginato e poli-hidroxibutirato pela *Azotobacter vinelandii*. *Acta Scientiarum. Technology*, Maringá, v. 32, n. 2, p. 105-112, 2010a.

SILVA, A. N.; GARCIA-CRUZ, C. H. Biopolymers by *Azotobacter vinelandii*. In:\_. *Biopolymers*. Croatia: Sciyo, 2010b, p. 413-438.

SILVA, C. F.; ARCURI, S. L.; CAMPOS, C. R.; VILELA, D. M.; ALVES, J. G.; SCHWAN, R. F. Using the residue of spirit production and bio-ethanol for protein production by yeasts. **Waste Management**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 108–114, 2011.

SMIDSRØD, O. Solution Properties of Alginate. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 13, n. 3, p. 359-372, 1970.

SMIDSRØD, O.; SKJÅK-BRÆK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 8, n. 3, p. 71-78, 1990.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 195, n. 1, p. 19-23, 1952.

SREETHAWONG, T.; CHATSIRIWATANA, S.; RANGSUNVIGIT, P.; CHAVADEJ, S. Hydrogen production from cassava wastewater using an anaerobic sequencing batch reactor: Effects of operational parameters, COD:N ratio, and organic acid composition. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 35, n. 9, p. 4092-4102, 2010.

STEIGEDAL, M.; SLETTA, H.; MORENO, S.; MAERK, M.; CHRISTENSEN, B. E.; BJERKAN, T.; ELLINGSEN, T. E.; ESPIN, G.; ERTESVÅG, H.; VALLA, S. The *Azotobacter vinelandii* AlgE mannuronan C-5-epimerase family is essential for the in vivo control of alginate monomer composition and for functional cyst formation. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 10, n. 7, p. 1760-1770, 2008.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, Elmsford, v. 25, n.10, p. 1503-1555, 2000.

SURIYAMONGKOL, P.; WESELAKE, R.; NARINE, S.; MOLONEY, M.; SHAH, S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants – A review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 25, n. 2, p. 148-175, 2007.

SUZUKI, D. V.; CARTER, J. M.; RODRIGUES, M. F. A.; SILVA, E. S.; MAIORANO, A. E. Purification of polyhydroxybutyrate produced by *Burkholderia cepacia* IPT64 through a chemical and enzymatic route. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 771-775, 2008.

TEEKA, J.; IMAI, T.; CHENG, X.; REUNGSANG, A.; HIGUCHI, T.; YAMAMOTO, K., SEKINE, M. Screening of PHA-Producing Bacteria Using Biodiesel-Derived Waste Glycerol

as a Sole Carbon Source. **Journal of Water and Environment Technology**, Tokyo, v. 8, n. 4, p. 373-381, 2010.

TOKIWA, Y.; CALABIA, B. P. Biodegradability and biodegradation of polyesters. **Journal of Polymers and the Environment**, Lowell, v. 15, n. 4, p. 259-267, 2007.

TOKIWA, Y.; CALABIA, B. P.; UGWU, C. U.; AIBA, S. Biodegradability of plastics. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 10, n. 9, p. 3722-3742, 2009.

TRUJILLO-ROLDAN, M. A.; MORENO, S.; SEGURA, D.; GALINDO, E.; ESPIN, G. Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 60, n. 3, p. 733-737, 2003.

TSENG, M.; HOANG, K. C.; YANG, M. K.; YANG, S. F.; CHU, W. S. Polyester-degrading thermophilic actinomycetes isolated from different environment in Taiwan. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 18, n. 5, p. 579-583, 2007.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Plantas tóxicas**. Disponível em: [http://felix.ib.usp.br/bib141/Textos\\_Aulas/T6\\_PT.PDF](http://felix.ib.usp.br/bib141/Textos_Aulas/T6_PT.PDF). Acesso em 11 de maio de 2011.

VAN-THUOC, D.; QUILLAGUAMÁN, J.; MAMO, G.; MATTIASSON, B. Utilization of agricultural residues for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 4, p. 420-428, 2008.

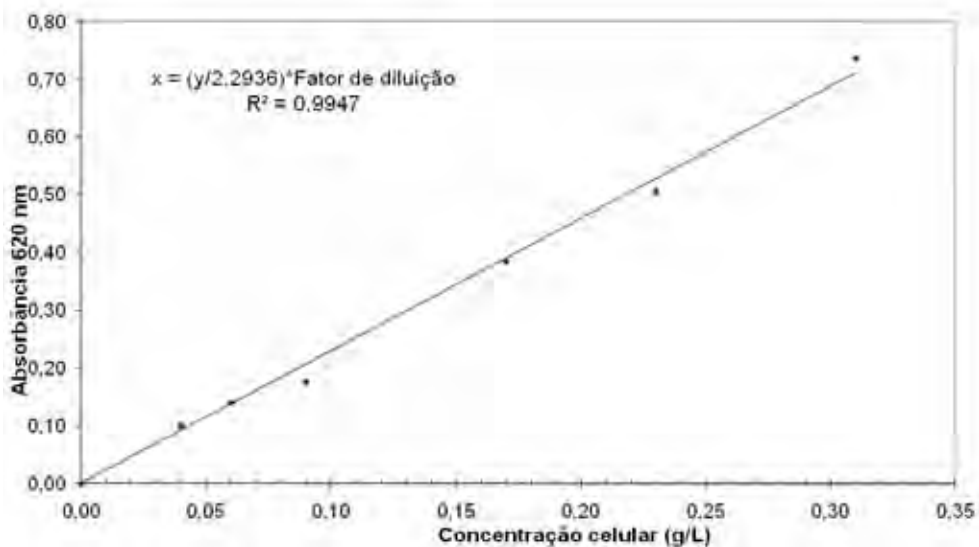
VARGAS-GARCÍA, M. C.; LÓPEZ, M. J.; ELORRIETA, M. A.; SUÁREZ, F.; MORENO, J. Physiology of exopolysaccharide production by *Azotobacter vinelandii* from 4-hydroxybenzoic acid. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 29, n. 3, p. 129-133, 2002.

WIKIPÉDIA. **Brown algae**. Disponível em: [http://en.wikipedia.org/wiki/Brown\\_algae](http://en.wikipedia.org/wiki/Brown_algae). Acesso em: 10 de maio de 2011.

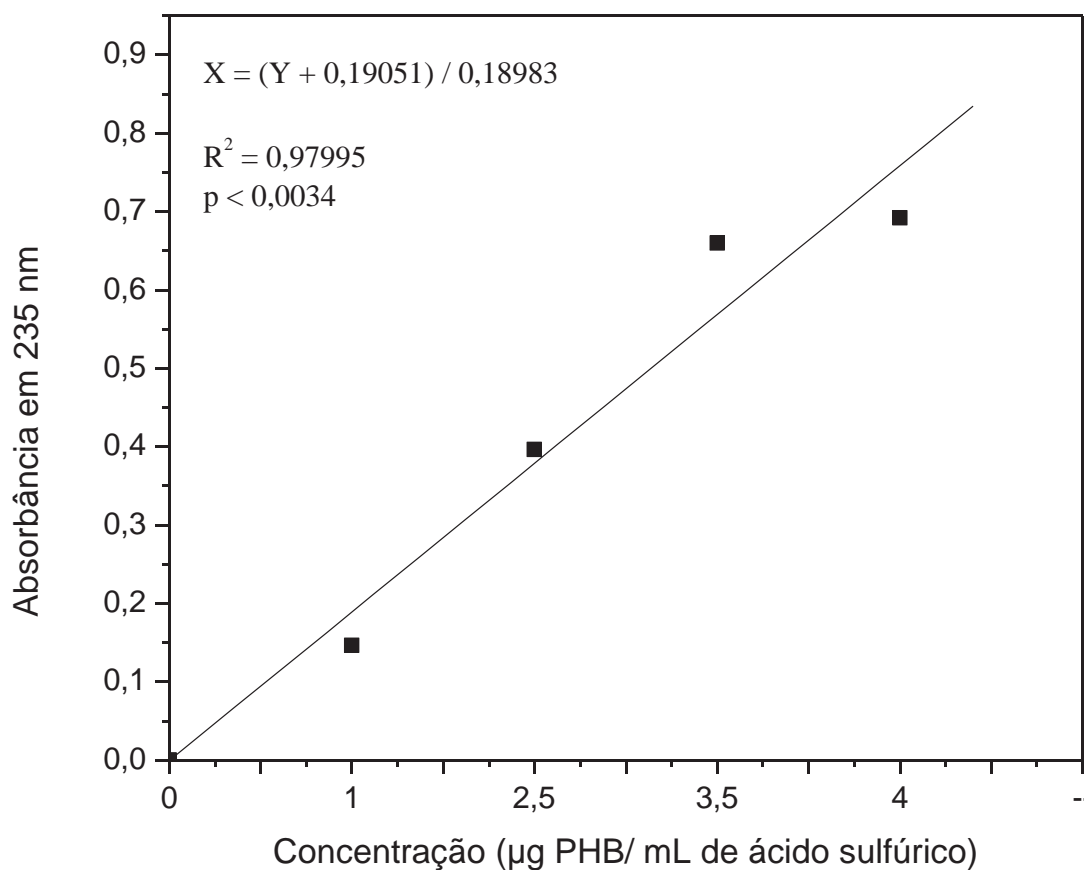
ZANZIG, J.; SCHOLZ, C. Effects of poly(ethylene glycol) on the production of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) by *Azotobacter vinelandii* UWD. **Journal of Polymers and the Environment**, Springer, v. 11, n. 4, p. 145-154, 2003.



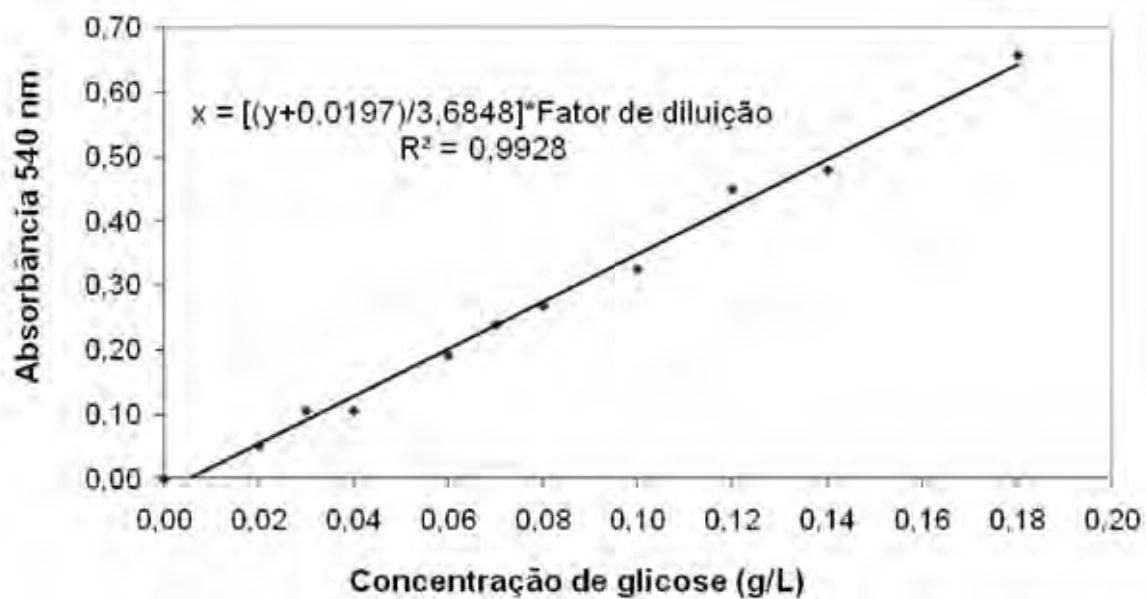
## APÊNDICE



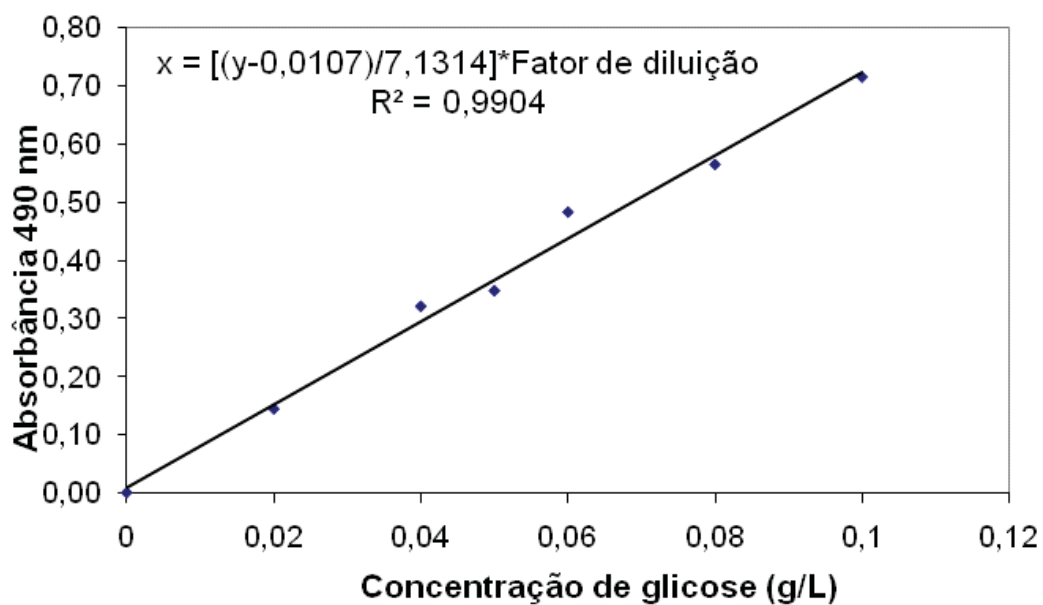
*Figura 29. Curva de calibração para determinação da biomassa.*



*Figura 30. Curva de calibração para determinação de poli-hidroxibutirato (PHB) pelo método de Law e Slepecky (1961).*



*Figura 31. Curva de calibração para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi (1952) e Nelson (1944).*



*Figura 32. Curva de calibração para determinação de açúcares totais pelo método descrito por Dubois e colaboradores (1956).*

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 16 de março de 2012.

---

Assinatura