



# BIOTRANSFORMAÇÃO DE RESÍDUOS A BIOPLÁSTICOS E BIOCOMBUSTÍVEIS

ANA MARIA QUEIJEIRO LÓPEZ  
ANNA KAROLINE AZEVEDO FARIAS  
AMANDA LYS DOS SANTOS SILVA  
ELANE CRISTINA LOURENÇO DOS SANTOS

# BIOTRANSFORMAÇÃO DE RESÍDUOS A BIOPLÁSTICOS E BIOCOMBUSTÍVEIS

ANA MARIA QUEIJEIRO LÓPEZ  
ANNA KAROLINE AZEVEDO FARIAS  
AMANDA LYS DOS SANTOS SILVA  
ELANE CRISTINA LOURENÇO DOS SANTOS



**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Departamento de Tratamento Técnico da Editora da Ufal**  
Bibliotecária responsável: Fernanda Lins de Lima

L864p Lopez, Ana Maria Queijeiro.  
Biotransformação de resíduos a bioplásticos e biocombustíveis / Ana Maria Queijeiro López, Anna Karoline Azevedo Farias, Amanda Lys dos Santos Silva, Elane Cristina Lourenço dos Santos. – Maceió : [EDUFAL], 2017.  
50 p. : il. – (Conversando sobre ciências em Alagoas, n 2 2017).  
  
Bibliografia: p. 43-49.  
ISSN: 2238-9911.  
  
1. Biodegradação. 2. Sustentabilidade. 3. Poluentes. I. López, Ana Maria Queijeiro, autora. II. Farias, Anna Karoline Azevedo, autora. III. Santos Silva, Amanda Lys dos, autora. IV. Santos, Elane Cristina Lourenço dos, autora.

CDU: 504.4

CONVERSANDO SOBRE CIÊNCIAS EM ALAGOAS

# BIOTRANSFORMAÇÃO DE RESÍDUOS A BIOPLÁSTICOS E BIOCOMBUSTÍVEIS

ANA MARIA QUEIJEIRO LÓPEZ  
ANNA KAROLINE AZEVEDO FARIAS  
AMANDA LYS DOS SANTOS SILVA  
ELANE CRISTINA LOURENÇO DOS SANTOS



## RESUMO

Por muito tempo, o petróleo tem sido a principal fonte para produção de energia, além de matéria-prima para a industrialização e geração de vários produtos, em especial nas áreas mais urbanizadas do globo. Atualmente, no entanto, a humanidade se vê diante de um impasse - a extensa demanda e quadro restrito de oferta dos combustíveis fósseis de impactos negativos ao meio ambiente, torna fundamental a busca e utilização racional de produtos e processos alternativos, garantindo não só o presente, mas o futuro do planeta e suas diferentes espécies. Resíduos que antes preocupavam apenas pela questão de remoção ambiental, podem ter um destino mais sustentável, convertendo-se em matéria-prima para gerar combustíveis renováveis e produtos biodegradáveis. O objetivo desta cartilha é apresentar, como exemplo de energia limpa e remoção de carga orgânica poluente, a produção de biocombustíveis e bioplásticos a partir de estratégias envolvendo microrganismos.

**Palavras-chave:** biodegradação; energia limpa; hidrogênio molecular; polihidroxicarboxilatos; poluentes; sustentabilidade.



# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	09
2. PLÁSTICO <i>VERSUS</i> BIPLÁSTICO .....	11
3. BIOCOMBUSTÍVEIS LÍQUIDOS E BIOHIDROGÊNIO .....	29
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	41
REFERÊNCIAS .....	43





# 1

## INTRODUÇÃO

Perante o esgotamento dos combustíveis fósseis sob o solo e o fundo do mar, elevando seus preços e gerando mudanças climáticas ocasionadas por sua combustão, fazem-se necessárias políticas de eficiência energética. Assim, tecnologias de energia renováveis com baixo nível de carbono no abastecimento mundial, têm recebido subsídios globais, os quais atingiram 120 milhões de dólares em 2013.

Estima-se que a demanda brasileira total de energia, no período 2013-2050, se eleve duas vezes mais comparada ao ano 2012, destacando o avanço para o gás natural e eletricidade, e recuo do consumo de derivados de petróleo/carvão vegetal, em função da penetração de biocombustíveis no setor de transportes (EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA, 2014). Com a redução dos custos de produção e o apoio contínuo, estas representarão 50% do aumento da geração total de eletricidade em 2040 (NETTO & LEAL, 2012), enquanto a de biocombustíveis no Brasil crescerá mais de 200% até 2035, atingindo 4,1 milhões de barris por dia (IEA, 2014).

Biocombustíveis produzidos a partir de produtos vegetais ou compostos de origem animal são, geralmente, biodegradáveis. As fontes mais conhecidas no mundo são a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), o milho (*Zea mays* L.), a soja (*Glycine max* L.), o girassol (*Helianthus annuus*), e a celulose de madeira como de eucaliptos. A partir delas é possível produzir etanol e biodiesel (PETROBRAS, 2007). Outra alternativa é o hidrogênio molecular, de elevada densidade energética e cuja combustão resulta em vapor de água, podendo ser gerado por bioprocessos menos onerosos que os eletroquímicos através de material de descarte (sólido ou líquido), como é o caso dos resíduos oriundos de atividades agrícolas, domésticas e/ou industriais (NEVES, 2009).

Em termos globais, rejeitos sólidos domésticos e/ou industriais excedem a taxa de urbanização, atingindo a taxa diária de 1,2 quilos por pessoa, e considerando a expansão demográfica, que é atualmente de cerca de 7,5 bilhões de seres humanos, e da renda, a estimativa para 2020 é que se atinja 2,2 bilhões de toneladas anuais de resíduos sólidos no mundo (WORLD BANK, 2012).

No Brasil, a tendência é a mesma mundial, isto é, cresce a cada ano a geração de resíduos descartáveis pela sociedade, e 40% desse material são despejados diretamente em lixões (vazadouros), visto que apenas 27% dos municípios brasileiros apresentam aterros sanitários (ABRAMOVAY, 2013). Além disso, vários dos resíduos não são biodegradáveis, sendo a maior parte deles plásticos como os polietilenos (PEBD e PEAD), polietileno tereftalato (PET), poliestireno (PS), polipropileno (PP), poliuretano (PU), cloreto de polivinila (PVC) e nylon (SHAH et al., 2008), revolucionários devido a sua versatilidade, fácil modelagem e baixo custo em comparação com outros produtos, mas que persistem no ambiente por centenas de anos. Sua incineração emite gases tóxicos como o dióxido de carbono e o metano, contribuindo, em longo prazo, para alterações climáticas a nível mundial.

Diante disso, a produção de plásticos bio e fotodegradáveis (ARIKAN & OZSOY, 2015) para substituir os sintéticos em várias de suas aplicações tornou-se também essencial, e considerando-se que várias espécies de microrganismos acumulam polihidroxialcanoatos (PHAs) como reserva energética, e que estes atuam como bioplásticos, os interesses voltaram-se para a otimização de bioprocessos de geração dos mesmos, assim como para a produção de biocombustíveis como o gás hidrogênio, tornando-os competitivos em termos de custo caso se utilize como matéria-prima diferentes rejeitos poluentes.



# 2

## PLÁSTICO *versus* BIOPLÁSTICO

Polímeros (poli: muitos, meros: partes) são macromoléculas constituídas pela repetição de unidades químicas denominadas monômeros. Eles podem existir em estado amorfo (isto é, com disposição desordenada das moléculas) ou cristalino (com ordenação tridimensional); sendo que na maioria dos casos, a estrutura do polímero se apresenta parcialmente amorfa ou cristalina, sendo chamados de polímeros semicristalinos (NUNES & LOPES, 2014). Uma vez que são bastante versáteis, os polímeros foram os responsáveis por grande parte das mudanças tecnológicas realizadas pelo ser humano na segunda metade do século XX. Enquanto as borrachas e as fibras sintéticas revolucionaram o desenvolvimento dos setores automotivo, eletroeletrônico e têxtil (TOKIWA *et al.*, 2009; WEBB *et al.*, 2013; NUNES & LOPES, 2014), os plásticos dominaram especialmente a indústria de embalagens e se tornaram os polímeros industriais mais conhecidos no mundo.

Os monômeros dos plásticos sintéticos são obtidos de fonte petroquímica e ligados repetitivamente em cadeia (WASHAM, 2010). Durante muito tempo, foram utilizados de forma promissora na fabricação de vários tipos de utensílios, visto seu baixo custo e versatilidade em comparação com outras matérias primas, como metais, tecidos, madeiras, etc. A aplicação abrangente desse material pode ser demonstrada partindo do consumo brasileiro do plástico, equivalente a 6,2 milhões de toneladas em 2011, sendo cerca de 40% deste montante destinados apenas a produção de embalagens, 15% a itens de construção civil, 4% ao setor agrícola, 1,5% designados a peças automotivas, e, na sequência, surgem os produtos hospitalares, eletrodomésticos, cosméticos e farmacêuticos (AMARAL, 2011).

Por outro lado, um dos principais atrativos do plástico sintético é, também, seu maior inconveniente - sua alta capacidade de resistir à degradação. Segundo estudos da Agência de Conservação Oceânica, o primeiro item dentre resíduos perigosos e com maior frequência nos mares corresponde às sacolas plásticas (prevalência de 5,4%) (SANTOS *et al.*, 2012). Essas sacolas são fabricadas a par tir do polietileno (PEBD e PEAD) ou polipropileno (PP), podem levar até 500 anos para serem decompostas, sendo relatado que o consumo mundial desses produtos chega a 1 milhão por minuto (VALERO-VALDIVIESO *et al.*, 2013). Considerando-se o contingente populacional a consumir esse tipo de material de curto período de vida útil, seu acúmulo tornou-se inevitável. Nos resíduos urbanos e industriais, o plástico tornou-se o terceiro componente mais frequente, perdendo apenas para o desperdício alimentar e de derivados de papel (PHILP *et al.*, 2013).

De maneira geral, a decomposição natural dos plásticos começa com a fotodegradação, que leva à termoxidação, isto é, a a luz ultravioleta (UV) solar fornece a energia de ativação necessária para iniciar a incorporação dos átomos de oxigênio no polímero, deixando o plástico quebradiço; como consequência, formam-se fragmentos de peso molecular baixo o suficiente para só então ocorrer a biodegradação microbiana, convertendo o carbono presente em CO<sub>2</sub> ou a incorporação do mesmo em biomoléculas. Esse processo pode levar mais de meia década (TOKIWA *et al.*, 2009; WEBB *et al.*, 2013).

O que se observa nos dias atuais, portanto, é seu acúmulo – em lixões e aterros com pouca capacidade ou em oceanos (Figura 1). Um estudo realizado no Atlântico Norte revelou o equivalente a 580 mil peças de plástico por quilômetro quadrado (ARIKAN & OZSOY, 2015), e, segundo pesquisadores da expedição *Race for Water Odyssey*, realizada em 2015 por todos os oceanos, 260 bilhões de toneladas desse produto estão acumuladas nos mesmos (Figura 2).

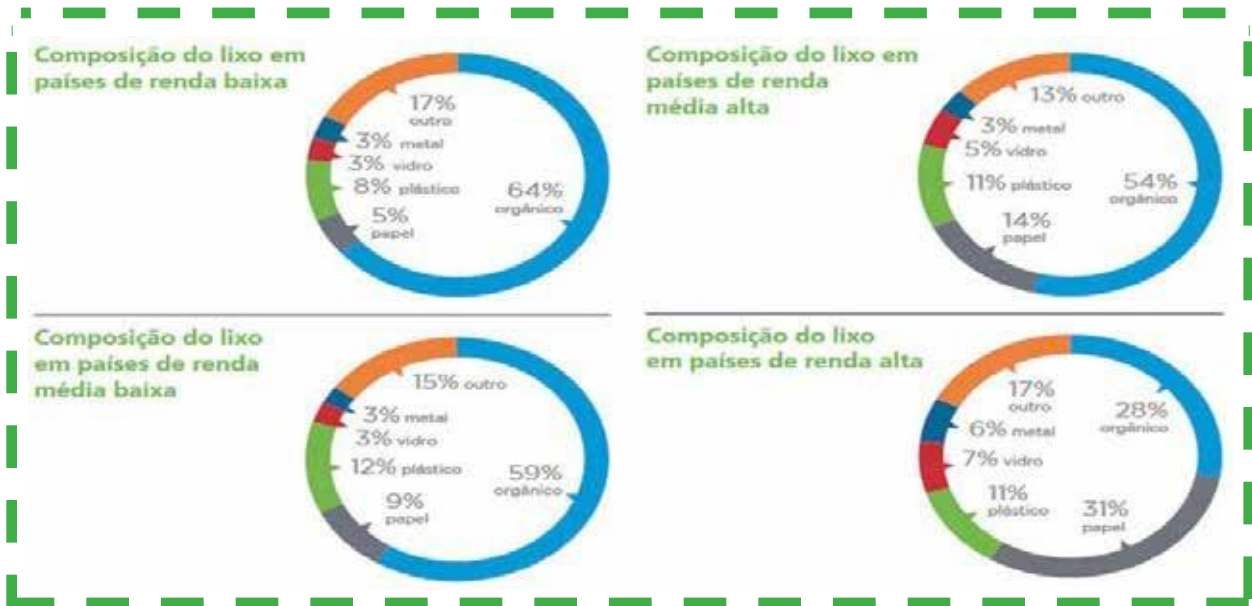


Figura 1 - Composição dos resíduos sólidos em função da renda nacional.  
 Fonte: WORLD BANK, 2012.

Assim, a medida em que a população mundial deu-se conta da problemática ambiental desses polímeros, em especial no final do século XX, iniciou-se uma intensa busca por outros biodegradáveis (Tabela 1) e/ou provenientes de matéria-prima renovável, normalmente polímeros de carboidratos ou óleos vegetais (PRADELLA, 2006), mantendo-se, porém, as mesmas características de utilização dos diferentes plásticos sintéticos. A estes biopolímeros acumulados no interior de células (poliésteres, polissacarídeos ou poliamidas) de bactérias, fungos e algas, por processos metabólicos complexos, para servirem de reserva energética, ou serem secretados extracelularmente (polissacarídeos), durante o ciclo de crescimento dos mesmos (RAO *et al.*, 2014), deu-se o nome de bioplásticos. No entanto, nem todos são gerados a partir de fontes renováveis ou são de fácil biodegradabilidade, ainda que uma destas duas características deva estar presente para este ser considerado um bioplástico (Tabela 2).

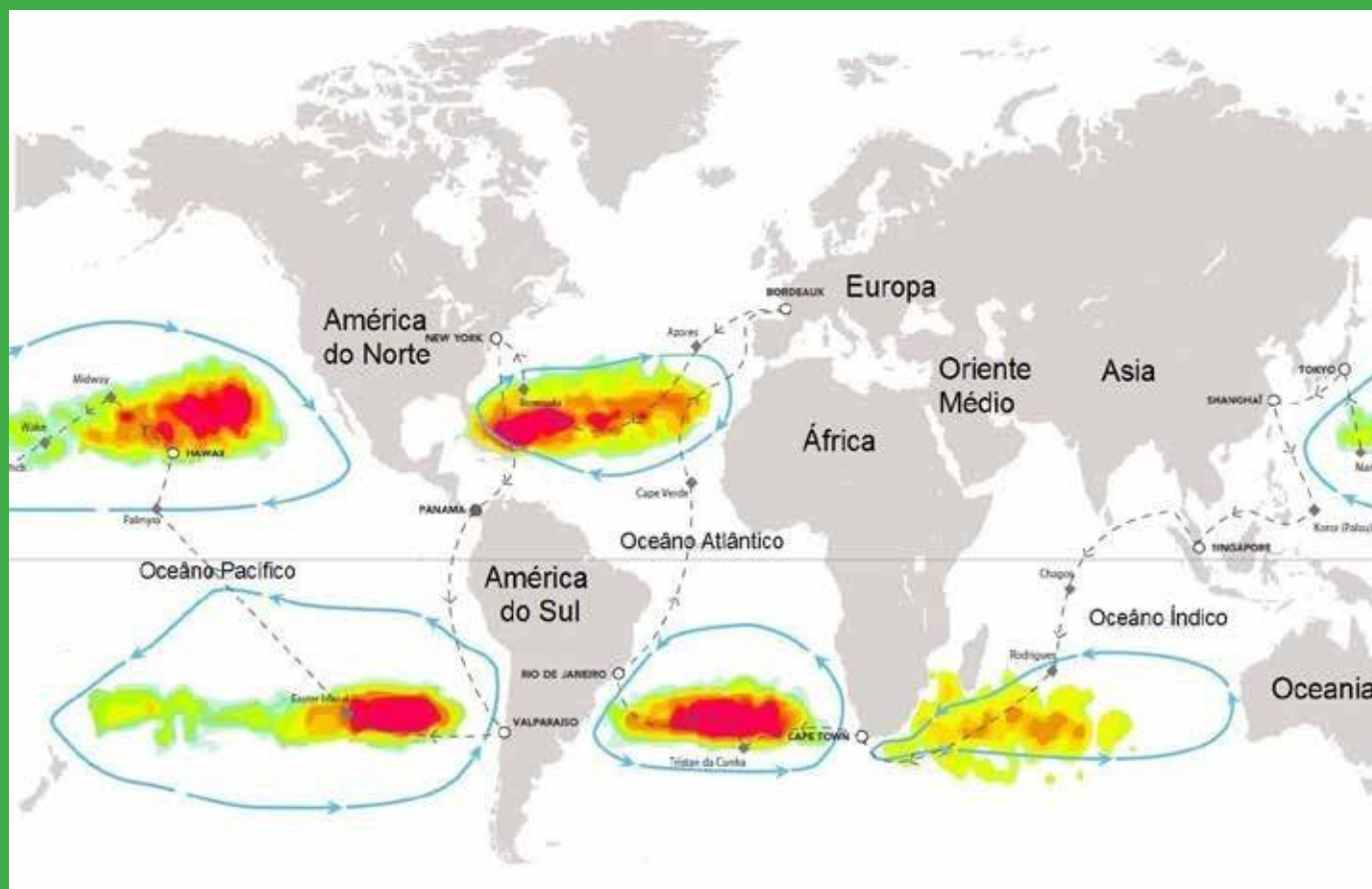
Tabela 1- Degradabilidade ambiental dos plásticos sintéticos.

Resistência a degradação ambiental	Requisito necessário na cadeia	Exemplo de cisão molecular
Degradável	Ligação insaturada entre carbonos	$\text{---C=C---C=C---}$
	Átomo de carbono terciário	$\text{---C-C(CH}_3\text{)-C---}$
	Cadeia sem ramificação	$\text{---C-C-C-C-C---}$
Degradável e biodegradável	Ligação éster	$\text{---C(=O)O---}$
	Ligação amida-acil	$\text{---C(=O)NH}_2\text{---}$
	Ligação acetal	$\text{---C(OH)(CH}_2\text{OH)-C(OH)(CH}_2\text{OH)-C(OH)(CH}_2\text{OH)---}$

Fonte: MANO; PACHECO; BONELLI (2005) *apud* MANO & MENDES, 2013.

## VOCÊ SABIA?

Pesquisadores de uma fundação suíça baseada em Lousanne, organizaram uma expedição visando avaliar a quantidade de rejeitos nos oceanos. Partindo de Bordeaux, França, em 15 de Março de 2015, a chamada, *Race for Water Odyssey* (R4WO), percorreu 32 mil milhas náuticas até Dezembro de 2015, coletando dados a serem publicados. No entanto, adiantou-se que, desde áreas populosas a regiões isoladas e bem preservadas dos oceanos, 80% de sua poluição é composta por cerca de 260 bilhões de toneladas de plásticos. Segundo o presidente e organizador da expedição, Dr. Marcos Simeoni, mesmo encontrando-se resíduos em qualquer parte dos oceanos, cinco grandes regiões concentram mais os despejos em função das correntes marítimas (zonas de convergência).



**Figura 2** - Zonas de convergência, onde estão concentradas grandes quantidades de resíduos, segundo constatado pela expedição *Race for Water Odyssey* (R4WO), de Março a Dezembro de 2015. Fonte: Adaptado de ((O)) ECO, 2015.

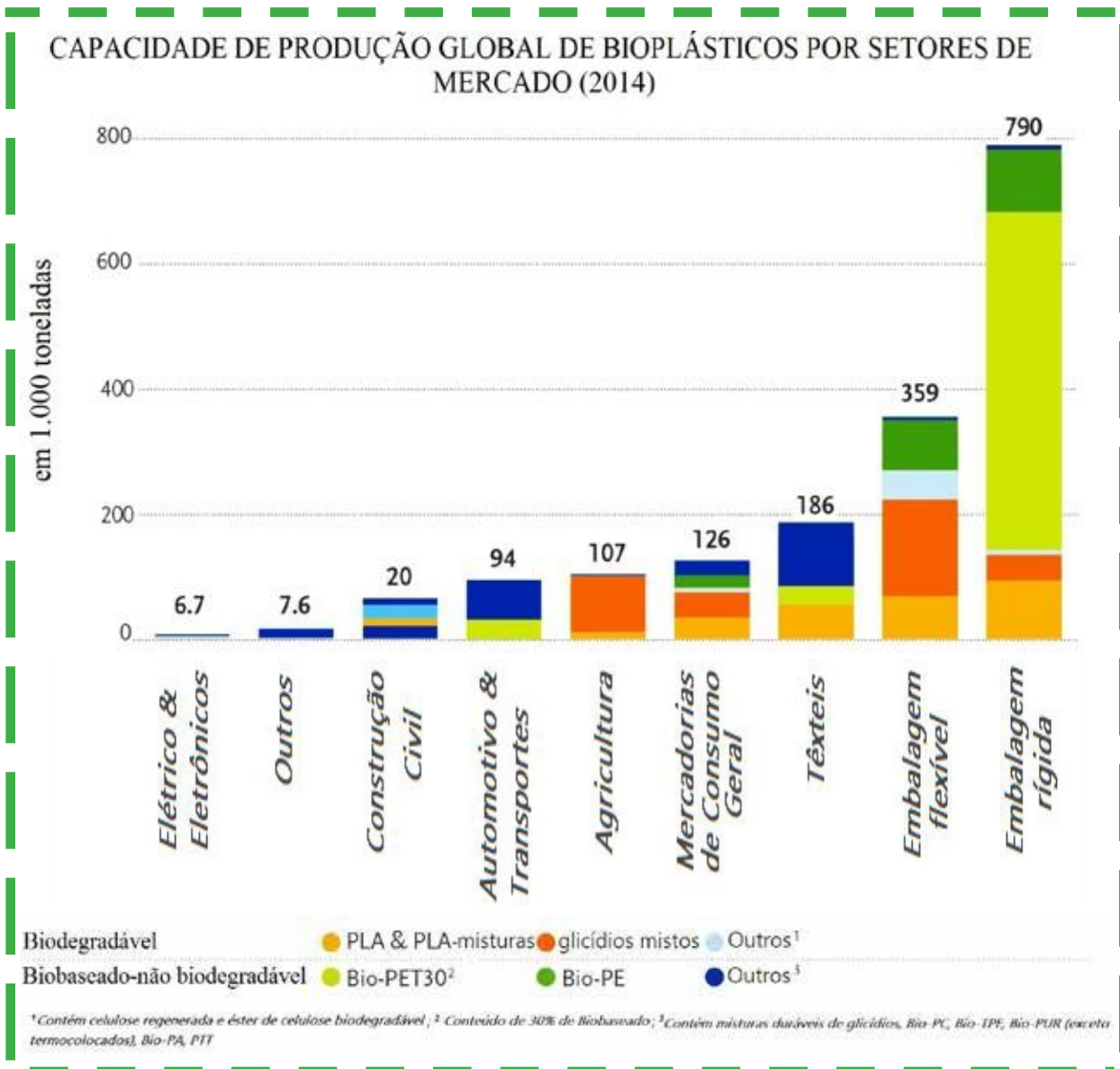
**Tabela 2** - Principais famílias de bioplásticos produzidos em escala comercial ou semi-comercial.

Polímeros de amido (PA)	Polissacarídeo	Polímero natural modificado
Poliactatos (PLA)	Poliéster	Ácido láctico produzido por fermentação seguido de polimerização
Polihidroxicanoatos (PHAs)	Poliéster	Produzido por fermentação direta de fonte de carbono por microorganismos ou em vegetais geneticamente modificados
PHB - homopolímero poli(3-hidroxi-butarato)		
PHB/HV - copolímero de poli(3-hidroxi-butarato) e 3-hidroxi-valerato		
PHB/HHx - copolímero de poli(3-hidroxi-butarato) e 3-hidroxi-hexanoato		
Poliésteres Alifáticos - Aromáticos (PAA)	Poliéster	
Poli(trimetileno tereftalato) (PTT)		1-3 propanodiol produzido por fermentação seguido de copolimerização com ácido tereftálico (AT) ou dimetil tereftalato (DMT)
Polibutileno tereftalato (PBT)		1-4 butanodiol produzido por fermentação seguido de copolimerização com AT
Polibutileno succinato (PBS)		1-4 butanodiol copolimerizado com ácido succínico, ambos produzidos por fermentação
Poliuretanas (PURs)	Poliuretano	Polimerização de polióis obtidos por fermentação ou purificação química com isocianatos petroquímicos
Nylon	Poligamia <sup>1</sup>	
Nylon 6		Caprolactama produzida por fermentação
Nylon 66		Ácido adípico produzido por fermentação
Nylon 69		Monômero obtido por transformação química do ácido oléico

<sup>1</sup> Poligamia: Coexistência de flores unissexuais (masculina e feminina) e hermafroditas numa mesma espécie.

Fonte: PRADELLA, 2006.

Em 2014, a produção mundial de bioplásticos superou a marca de 1,6 milhão de toneladas, representando cerca de 1% da produção mundial de plásticos (Figura 3). Espera-se que essa produção quadruple em 2018, atingindo 6,7 milhões de toneladas a serem aplicadas em nichos específicos de mercado que agreguem um apelo sustentável ao produto. Essa previsão é feita considerando as possibilidades apresentadas em diversas áreas, como nas indústrias de informação, higiene, embalagens, brinquedos, veterinária, agrícola, escolar, escritório e automobilística (ABIEF, 2015). Pesquisas apontam que o consumidor em países mais desenvolvidos está disposto a pagar até 20% a mais por produtos ambientalmente corretos. Tecnicamente, os bioplásticos poderiam substituir cerca de 85% dos polímeros consumidos, porém, o volume produzido ainda não é suficiente para tornar isto uma realidade a curto ou médio prazo (NOVA-INSTITUTE, 2014).



**Figura 3** - Aplicações do mercado de bioplásticos.

Fonte: Adaptado de NOVA-INSTITUTE (*European Bioplastics*, Institute for Bioplastics and Biocomposites), 2014.

O mercado de bioplásticos ainda é incipiente no Brasil (menos de 1% em 2011), sendo que a maior parte provém de importações ou de produção em escala piloto, considerando apenas as resinas em si, como PLA (ácido polilático), PHB (polihidroxibutirato) e aquelas derivadas do amido da batata, por exemplo. Embora com pontos ambientalmente positivos da produção de biopolímeros, as empresas brasileiras enfrentam obstáculos que persistem para a consolidação dos bioplásticos no campo comercial, pois ainda que se posicionem em produtos de maior valor agregado e aplicações de nicho, graças ao seu maior preço e apelo de sustentabilidade, a redução de custo e o aumento de produtividade são alguns dos desafios para firmá-los, isto é, o consumidor brasileiro em geral ainda não está disposto a pagar mais por um produto ecoeficiente, sendo de crucial importância que os produtores busquem reduzir os custos de produção.

Outro desafio bastante significativo é o desconhecimento dos consumidores brasileiros sobre tais produtos e a ausência de uma regulamentação específica para os mesmos no país. Uma legislação mais robusta, abrangendo diversas aplicações e definindo como os bioplásticos e seus produtos serão certificados, pode garantir inclusive as exportações, identificando claramente, mediante uma logomarca, se o produto é biodegradável ou se deve ser



ANA MARIA QUELJEIRO LÓPEZ | ANNA KAROLINE AZEVEDO FARIAS | AMANDA LYS DOS SANTOS SILVA | ELANE CRISTINA LOURENÇO DOS SANTOS submetido ao processo de reciclagem convencional. Atualmente, os bioplásticos são destinados a nichos de mercado, com questões técnicas e econômicas a serem resolvidas para que sejam adotados em outros segmentos. A baixa resistência térmica de algumas resinas, por exemplo, restringe sua aplicação no segmento eletrônico. O PHB possui ponto de amolecimento em torno de 135 °C, não permitindo sua aplicação em carcaças de secadores de cabelos, por exemplo. Já os bioplásticos derivados do etanol e não- biodegradáveis, caso dos “verdes” polietileno (PE) e cloreto de polivinila (PVC) produzidos no Brasil, apresentam propriedades físico-químicas iguais às de resinas convencionais, são recicláveis, de origem renovável, e impulsionaram o mercado brasileiro de tal forma que o mesmo atingiu cerca de US\$ 500 milhões em 2015. Os bioplásticos derivados do milho, como o PLA, por exemplo, podem ter sua aplicação restrita no setor de embalagens para cosméticos, em que a transparência da resina é muitas vezes valorizada, e estes apresentam coloração amarelada. Afinal, a correta gestão da cadeia dos bioplásticos deverá garantir sua efetividade como “produto verde” da produção à sua disposição final. Assim, num prazo curto a médio, os bioplásticos não deverão representar uma ameaça aos plásticos petroquímicos, uma vez que seus volumes corresponderão a menos de 5% da demanda total no Brasil e as resinas convencionais continuarão focadas em aplicações de baixo custo (no caso das *commodities*) ou naquelas em que se exige alto desempenho técnico (no caso das especialidades). Por outro lado, o país possui uma vantagem competitiva imbatível para a produção de plásticos derivados da cadeia da cana-de-açúcar, por exemplo (PRADELLA, 2006).

É necessário, por tanto, envolver a sociedade e definir valores ecológicos e sociais ligados a esta iniciativa. Visando firmar a utilização de bioplástico nas indústrias, Iles & Martin (2013) apresentaram o planejamento de negócios com a trajetória necessária tanto para a permanência do produto no mercado, como também para torná-lo competitivo aos polímeros convencionais. A empresa Braskem, por exemplo (Figura 4), com acesso abundante ao etanol proveniente da fermentação de caldo de cana-de-açúcar, baseando-se na conversão de PVC a partir deste, passou a oferecer material biodegradável nas características principais do PE, e sem tantos custos.



**Figura 4** - Polo petroquímico de Triunfo, no Rio Grande do Sul, onde é produzido o polietileno verde da Braskem, com capacidade para produção de 200 mil toneladas anuais.

Fonte: BRASKEM, 2015.

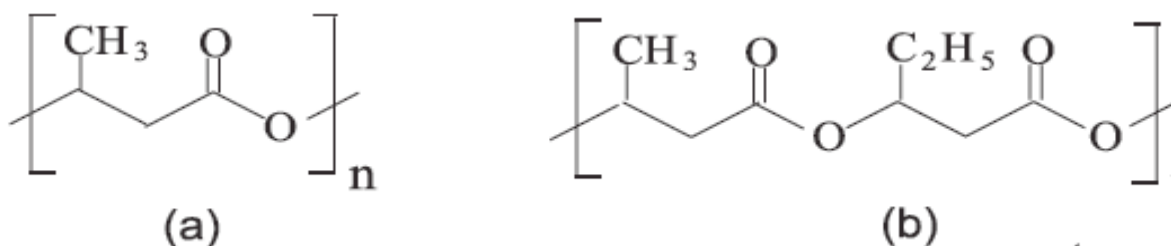
Aventa-se a hipótese de que se recursos agrícolas forem utilizados como substratos para produção de bioplásticos, é provável que quando altas taxas de consumo do biopolímero forem atingidas no futuro, surja um conflito de interesse com as culturas utilizadas, isto é, estas podem servir para alimentação, geração de bioenergia ou outros produtos provenientes de conversão (YATES & BARLOW, 2013). No entanto, atualmente, cerca de apenas 0,01% do

total de 5 bilhões de hectares da área agrícola mundial são usados para a produção de bioplásticos, o que está longe de competir com a produção de alimentos, isto é, 70% do solo agriculturável está ocupado com pastagens para pecuária, 26% com o cultivo de alimentos, 2% com culturas para produção de materiais como papel e madeira, 1% com vegetais para geração de biocombustíveis e 0,01% com o cultivo de matérias-primas para fabricação de bioplásticos, sendo que um aumento de 300% da escala de produção atual só elevará o uso do solo em mais 0,01%. A eficiência aumentada das matérias-primas e tecnologias agrícolas está melhorando continuamente as práticas agrícolas, e hoje tais melhorias ficam asseguradas com o estabelecimento de certificações fiáveis e independentes de sustentabilidade (NOVA-INSTITUTE, 2014).

Dessa forma, os processos microbianos da biotransformação de resíduos desses recursos é que apresentam grande potencial para sua conversão em material polimérico provedor durante a fabricação de bioplásticos que, após concluírem seu ciclo de uso, podem naturalmente ser biodegradados sem gerar substâncias nefastas ao meio ambiente.

Microorganismos capazes de utilizar resíduos orgânicos poluentes, como fontes de carbono para produzir tais polímeros tornaram-se uma ferramenta de biotecnologistas e geneticistas, não apenas para que estes viessem a otimizar a produção de bioplásticos em termos de quantidade e custo, mas também para que propusessem soluções para poluição ambiental (RAO *et al.*, 2014). A goma xantana, sendo o primeiro bem sucedido polissacarídeo bacteriano, produzido em larga escala pela bactéria *Xanthomonas campestris*, é composta por cinco grupos diferentes de monossacarídeos, e a pululana é um oligossacarídeo hidrossolúvel, produzido industrialmente por leveduras como *Aureobasidium pulullans* (RAO *et al.*, 2014). A dextrana, por sua vez, é um polissacarídeo produzido tanto intracelularmente quanto extracelularmente por diferentes bactérias e leveduras, sendo que nestas pode atuar como substância de reserva.

Por outro lado, os materiais com grande potencial para substituírem os plásticos sintéticos são representantes do grupo dos poliésteres, como os PHAs (Figura 5).



**Figura 5** - Estrutura química dos poli(hidroxialcanoatos) (PHAs): (a) poli(hidroxibutirato) ou PHB e (b) poli(hidroxibutirato-co- valerato) ou PHB-PHV.

Fonte: FRANCHETTI & MARCONATO, 2006.

As características gerais dos PHAs são: insolubilidade em água e relativa resistência a degradação hidrolítica; boa resistência a UV, porém baixa resistência a ácidos e bases; e solubilidade em clorofórmio e outros hidrocarbonetos clorados (BUGNICOURT *et al.*, 2014). São poliésteres estruturalmente simples, cuja classificação depende do número de átomos de carbono que compõem o grupo funcional R: enquanto os PHAs de cadeia curta, como o poli-3-hidroxibutirato, constituem-se de polímeros com monômeros de 3 a 5 carbonos, os PHAs de cadeia média são aqueles que têm monômeros com 6 a 14 carbonos (exemplos: poli-3- hidroxihexanoato e poli-3-hidroxioctanoato) (GAO *et al.*, 2011). Já o número de monômeros presentes no polímero pode variar de 100 a 30.000. Os PHAs de cadeia curta são geralmente mais cristalinos que os de cadeia média e usualmente exibem propriedades termoplásticas. Os de cadeia média, por sua vez, exibem propriedades elastoméricas ou adesivas dependendo do comprimento da cadeia lateral específica e do grau de instauração (SATOH *et al.*, 2011). Além disso, a presença de diferentes grupos funcionais na

ANA MARIA QUELJEIRO LÓPEZ | ANNA KAROLINE AZEVEDO FARIAS | AMANDA LYS DOS SANTOS SILVA | ELANE CRISTINA LOURENÇO DOS SANTOS  
cadeia lateral do PHA (hidroxil, carboxil, metil éster, halogenados, etc.) implica em novas propriedades físico-químicas (LÓPEZ, 2013). Mais de 150 diferentes unidades monoméricas são identificadas como constituintes dos PHAs (RIEDEL *et al.*, 2014), fazendo com que distintos tipos de polímeros sejam criados, aumentando sua gama de utilizações.

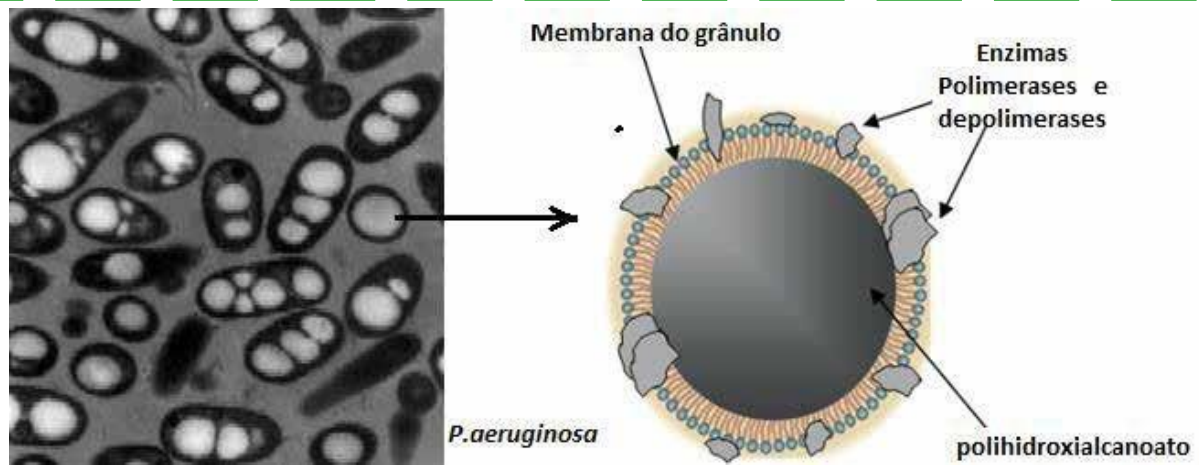
Um tipo de PHA com características similares às do PP, o PHB, foi descrito pela primeira vez em 1925 (CHEE *et al.*, 2010), e pode ser sintetizado por diferentes bactérias (ANDLER & DÍAZ-BARRERA, 2013). No entanto, há ressalvas em torno da fabricação de polímeros a par tir deste, visto a fragilidade de suas propriedades físicas e mecânicas, além do alto custo para desenvolvê-lo com pureza (SOROUDI & JAKUBOWICZ, 2013), tornando mais viável combiná-lo a outro polímero. Isso gera o copolímero poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato ou apenas PHB-PHV, o qual é mais maleável e resistente que o homopolímero (HAFUKA *et al.*, 2011).

Algumas bactérias, quando submetidas a determinado desequilíbrio nutricional (restrições de nitrogênio, oxigênio, magnésio e fósforo) acumulam PHA como substância de reserva em grânulos (Figura 6), sendo que os estudos relacionam tal mecanismo a uma estratégia adaptativa desses microrganismos em nichos ecológicos muito competitivos (Tabela 3), bem como a resistência a determinado estresse ambiental, uma vez que tais polímeros possuem propriedades termoplásticas biodegradáveis (LÓPEZ, 2013). Essas bactérias produtoras de PHA, portanto, pertencem a dois grupos: as que necessitam da restrição de um nutriente essencial (nitrogênio, oxigênio, fósforo ou magnésio) para sintetizar o polímero a par tir do excesso de fonte de carbono, como ocorrem com a *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas extorquens* e *P. oleovorans*, ou as que requerem a restrição nutricional e são capazes de acumular grandes quantidades do polímero ainda durante sua fase de crescimento, com utilização do carbono presente, como as estirpes de *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* recombinante e *Escherichia coli* recombinante (GONZÁLEZ GARCÍA *et al.*, 2013).

**Tabela 3** - Principais nutrientes cuja limitação estimula a produção de polihidroxialcanoatos (PHA) por bactérias.

<b>Microrganismo</b>	<b>Nutriente limitante</b>
<i>Alcaligenes latus</i> <i>Pseudomonas oleovorans</i> <i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Cupriavidus necator</i> (= <i>Ralstonia eutropha</i> ) <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Nitrogênio
<i>Azotobacter vinelandii</i> <i>Azotobacter beijerinckii</i> <i>Rhizobium</i> ORS571	Oxigênio
<i>Pseudomonas</i> sp. K.	Magnésio
<i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Caulobacter crescentus</i> <i>Pseudomonas oleovorans</i>	Fósforo

Fonte: BABEL & STEINBÜCHEL, 2001.



**Figura 6** - Grânulos de polihidroxicanoato (PHA) em *Pseudomonas aeruginosa*.

Fonte: Adaptado de SUDESH *et al.* 1998.

Existem relatos de mais de 300 diferentes espécies produtoras de PHAs, porém, nem todas têm sido trabalhadas e algumas são capazes de utilizar orgânicos poluentes como fonte de carbono, barateando o processo de produção do biopolímero, como *C. necator*, *P. oleovorans*, *A. latus* e *B. megaterium* (CHEE *et al.*, 2010; IOUNE *et al.*, 2016), sendo a última considerada a mais vantajosa por apresentar melhores condições para a produção industrial, podendo reunir cerca de 80% de sua massa seca em polímero (FIGUEIREDO *et al.*, 2014), e estirpes recombinantes, como de *E. coli*, que demonstraram também excelente desempenho na síntese de PHAs devido a seu rápido crescimento, capacidade de utilizar diversos substratos e acumular grandes quantidades dos polímeros, além destes se apresentarem mais longos e mais cristalinos (PHILP *et al.*, 2013).

A polimerização das unidades monoméricas durante a síntese de PHA ocorre por meio de uma cisteína conservada da PhaC sintase (Cys319), que atua como um sítio catalítico no qual a cadeia crescente de PHA é covalentemente ligada (VAN-THUOC *et al.*, 2012). Segundo Rehm (2003), a PhaC sintase é uma enzima inicialmente solúvel e torna-se anfipática somente quando começa a sintetizar a cadeia de poliéster, ao iniciar o processo de automontagem. O produto dessa reação geralmente é um homopolímero (GAO *et al.*, 2011) constituído de cadeias lineares de (R)-3-hidroxi butirato (3HB), ou seja, o poli-R-3-hidroxi butirato [P3(HB)] - o primeiro PHA descoberto (LEMOIGNE, 1926), mais comumente acumulado pelos microrganismos e melhor caracterizado e explorado (BUGNICOURT *et al.*, 2014). Além disso, o P3(HB) ainda possui propriedades mecânicas muito similares aos plásticos convencionais, tais como elevada temperatura de fusão (175 °C) e resistência à tração (30-35 MPa) (JENDROSSEK & PFIEFFER, 2014).

No tocante à formação in vivo dos grânulos de PHA microbianos (Figura 6), a revisão publicada por Jendrossek & Pfeiffer (2014) descreve três modelos atualmente propostos para sua formação – micela, brotamento arcabouço. Pelo modelo de micela, a enzima PhaC sintase começa a produzir moléculas de PHB desde que a concentração do substrato (3-hidroxi butiril-CoA) seja suficientemente elevada. A hidrofobicidade aliada a baixa solubilidade do PHB em ambiente aquoso resultam na agregação da cadeia polimérica nascente e formação de estruturas parecidas com micelas no citoplasma, sendo as moléculas de PhaC (parcialmente hidrofílicas) localizadas na superfície. Por esse modelo, os grânulos podem surgir em qualquer região do citoplasma. O modelo de brotamento, por sua vez, assume que a sintase está localizada ou ligada (direta ou indiretamente) à membrana citoplasmática, e que a cadeia de PHB nascente é liberada a par tir da bicamada da membrana, levando a formação do grânulo contendo parte da membrana, e quando este atinge um tamanho específico, é liberado e as fasinas e outras proteínas associadas juntam-se a ele. Por último, o modelo de arcabouço considera que a PhaC sintase está (ou se torna) ligada a uma molécula – ainda desconhecida – que serve como uma âncora dentro da célula. Acontecendo dessa forma, a localização subcelular dos grânulos de PHB dependerá tanto da natureza como também da localização nas células deste arcabouço. Apesar

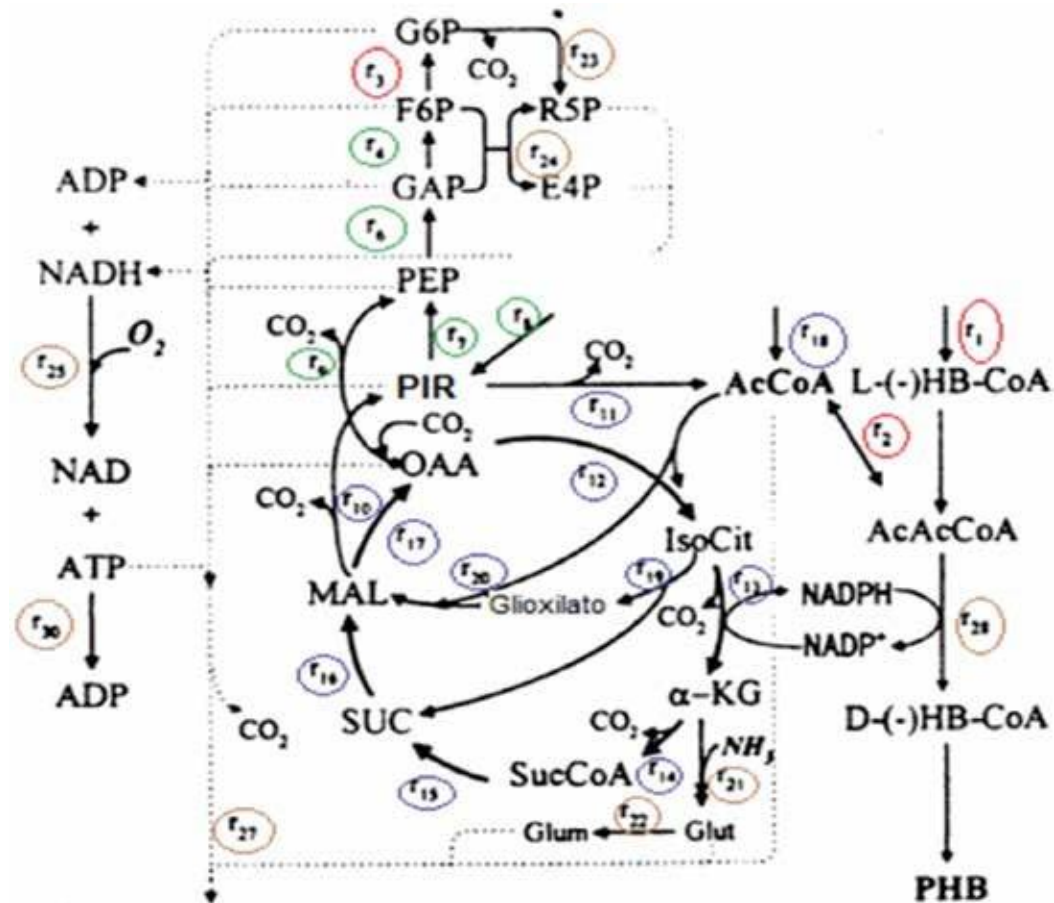
ANA MARIA QUELJEIRO LÓPEZ | ANNA KAROLINE AZEVEDO FARIAS | AMANDA LYS DOS SANTOS SILVA | ELANE CRISTINA LOURENÇO DOS SANTOS  
de os autores terem concluído que esse é o melhor modelo para explicar a formação dos grânulos de PHB em *C. necator*, os outros dois modelos ainda não podem ser descartados.

A maquinaria metabólica responsável pela produção do PHA, em muitos casos, não consiste apenas nas proteínas/enzimas que catalisam a síntese do polímero e formação do grânulo e sua hidrólise, mas sim na importante conexão com outras rotas centrais e periféricas do metabolismo microbiano como um todo. Em algumas bactérias, os intermediários utilizados na síntese do PHA advêm de rotas conectadas com o metabolismo do carbono ( $\beta$ -oxidação e síntese de novos ácidos graxos), em que o acetil-CoA é o ponto de conexão entre as rotas catabólicas e anabólicas do sistema. No gênero *Pseudomonas*, por exemplo, existe uma estreita relação entre a estrutura do ácido graxo utilizado como fonte de carbono e a composição do PHA armazenado (o monômero presente no polímero tem ramificação semelhante a de ácido graxo intermediários da  $\beta$ -oxidação, sugerindo que estes possam ser utilizados como substratos. Nesses microrganismos, portanto, pode ocorrer competição pelo substrato entre a PHA polimerase e enzimas do catabolismo de ácidos graxos (ESCAPA, 2012; LÓPEZ, 2013).

De acordo com Jendrossek & Pfeiffer (2014), três tipos de PHB com diferentes números de unidades de 3HB são conhecidos: a) PHB de estoque: são PHBs de elevado peso molecular ( $> 10^3$  resíduos de 3HB); b) oligo-PHB: PHB de baixo peso molecular (de 100 a 200 unidades de 3HB); c) PHB conjugado (cPHB): são aqueles nos quais um pequeno número de unidades de PHB ( $\leq 30$ ) estão covalentemente ligadas a proteínas. O PHB de estoque está presente apenas nos procariotos (*Eubacteria* e *Archaea*), enquanto os oligo-PHB e cPHB são constituintes de todos os procariotos e nos eucariotos que já foram estudados, e, portanto, devem estar presentes em todos os organismos, ainda que hajam poucos os estudos envolvendo os mesmos. O PHB de interesse como bioplástico é o de estoque, entretanto seu uso é limitado principalmente devido a sua fragilidade intrínseca. Como documentado na revisão de Bugnicourt *et al.* (2014), tem sido constatado inclusive uma cristalização secundária (que ocorre no polímero quando em temperatura ambiente), o que altera suas propriedades mecânicas ao longo do tempo. Verificou-se que amostras estocadas por 60 dias possuem alongamento de ruptura menor que as amostras que foram armazenadas na metade desse período, e considerando-se que a síntese de copolímeros a par tir de carboidratos é uma situação rara nos microrganismos (QUILLAGUAMÁN *et al.*, 2010) e que o PHB microbiano pode ser moldado e utilizado para a síntese de heteropolímeros com outros polímeros sintéticos (KHANNA & SRIVASTAVA, 2005), a produção de blendas pode ser uma solução para esse problema. Nessa forma, o polímero tem suas propriedades físicas melhoradas (isto é, menos frágil), diminui-se a temperatura do processamento e reduz-se o custo de produção. Por conta disso, esforços na fabricação de produtos contendo PHB estão focados na pesquisa em aditivos (plastificantes, agentes de nucleação, etc.) que sejam capazes de reduzir o processo de cristalização e melhorar a flexibilidade e alongamento do produto final (BUGNICOURT *et al.*, 2014).

Segundo Kessler & Witholt (2001), a regulação do metabolismo de PHA pode ocorrer: 1) por ativação da expressão do cluster *phaCAB* devido ao sinal específico do ambiente, como limitação de nutriente; 2) por ativação das enzimas para síntese de PHA por componentes específicos da célula ou intermediários metabólicos; 3) por inibição de enzimas metabólicas das vias competitivas e aumento de intermediários requeridos para a síntese de PHA; ou 4) por combinação dos fatores anteriores.

*C. necator*, por exemplo, cataboliza carboidratos a piruvato pela via Entner-Doudoroff (Figura 7). O piruvato pode ser desidrogenado/d Descarboxilado a acetil-CoA e seguir para via de produção de PHA por três reações sequenciais catalisadas pelas enzimas  $\beta$ -cetotiolase (acetil-CoA-acetiltransferase; EC 2.3.1.9), acetoacetil-CoA redutase (hidroxibutiril-CoA desidrogenase; EC 1.1.1.36) e poli-D(-)-3-hidroxibutiril-CoA sintase [P3(HB) polimerase], gerando tanto homopolímeros P(3HB) quanto heteropolímeros P(3HB-co-3HV) (HOLMES, 1985). A  $\beta$ -cetotiolase, compete por acetil-CoA com várias outras vias metabólicas, incluindo formação de acetato, depois de citrato e síntese de ácidos graxos. Essa enzima é inibida por moléculas de CoASH livres. Já a Acetoacetil-CoA redutase, requer o poder redutor do NADPH como cofator, de modo que sua atividade, assim como a concentração e razão entre NAD<sup>+</sup>/NADH, parece ser importante na regulação da síntese de P(3HB). Considerando, então, a via de Entner Doudoroff, o NADPH será derivado principalmente da ação de glicose-6- fosfatodesidrogenase (HAYWOOD *et al.*, 1988).

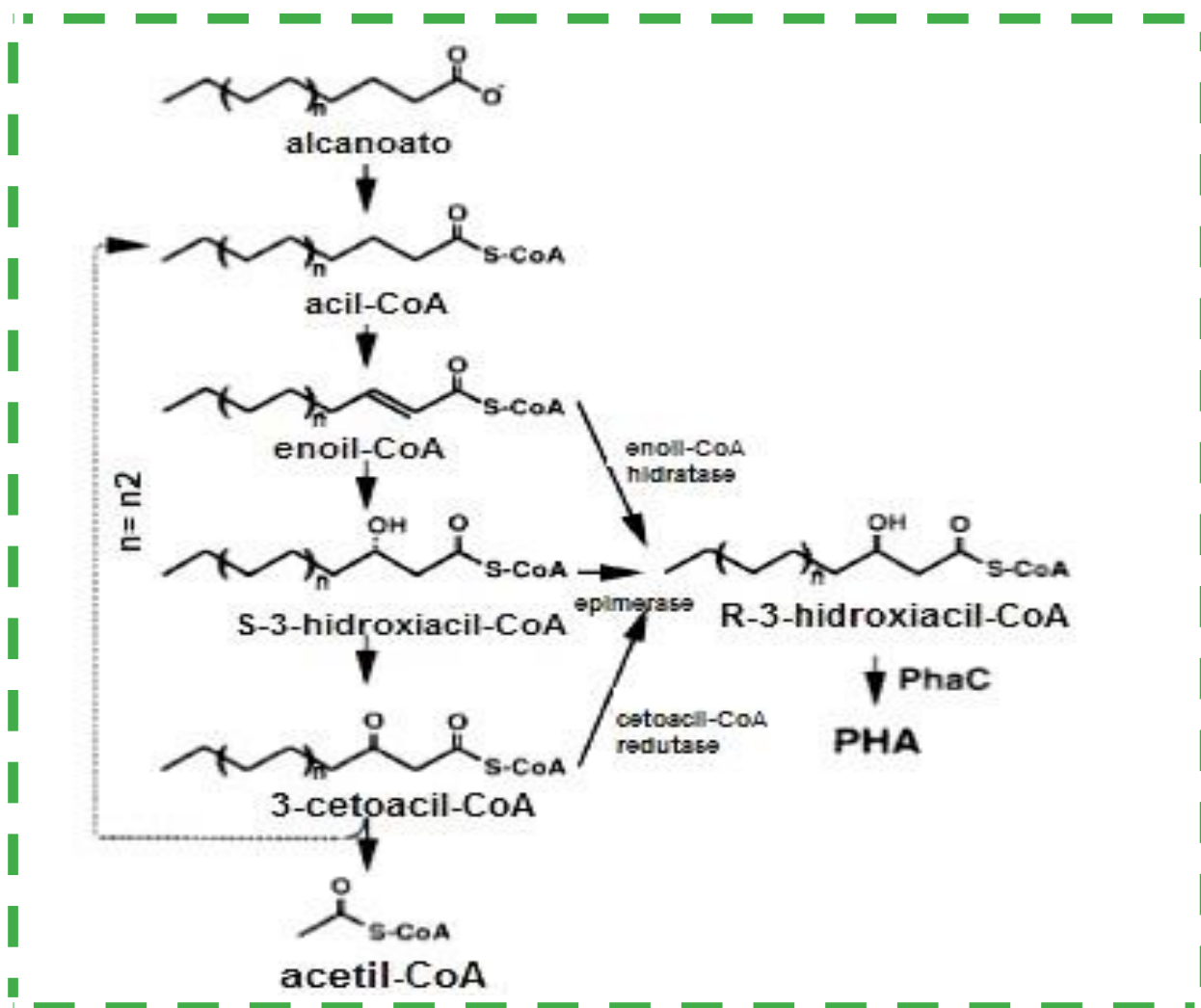


**Figura 7** - Rota da biossíntese de polihidroxibutirato (P3HB) por *Cupriavidus necator*. Quando da limitação da fonte de nitrogênio no meio, um fluxo aproximadamente constante para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos e o bloqueio na via biossintética de aminoácidos, especialmente na conversão de  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG) a glutamato (Glut) - na reação 21 (r21), que assimila o íon amônio no interior da célula, resulta em maior produção de NADPH (nicotinamida-adenina dinucleotídeo- fosfato reduzida), o que acelera a biossíntese de P3HB, uma vez que este pode diminuir o excesso de equivalentes redutores. r=reação; ATP=adenosina-tri-fosfato; ADP=adenosina-di-fosfato; G6P= glicose-6-fosfato; F6P= frutose-6-fosfato; GAP= gliceraldeído-fosfato; R5P= ribulose-5-fosfato; E4P= eritrose-4-fosfato; PEP= fosfoenolpiruvato; PIR= piruvato; AcCoA= acetil-CoA; AcAcCoA= acetoacetilCoA; L-(-) HB-CoA= L-hidroxibutiril-CoA; NADP+ou NAD+= NAD (fosforilada ou não) oxidada; D-(-)HB-CoA= D-hidroxibutiril-CoA; OAA= oxaloacetato; MAL= malato; IsoCit= Isocitrato; SUC= succinato; SucCoA=succinil-CoA.

Fonte: Adaptado de LEE *et al.*, 1995.

No caso da citrato sintase, a primeira enzima no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, esta não somente compete com a  $\beta$ -cetotiolase por acetil-CoA, mas também libera moléculas de CoASH livres, inibindo a síntese de P(3HB) (LEE *et al.*, 1995). Sob condições balanceadas de crescimento, os níveis de CoA são elevados, porém, sob limitação de nutrientes essenciais ao crescimento, e excesso de carbono, a formação de NADH inibe a citrato sintase e a isocitrato desidrogenase, elevando a concentração de acetil-CoA ao ponto de superar a inibição pela CoA e favorecer a condensação a acetoacetil-CoA, e, em seguida, a síntese de P(3HB). A degradação desse polímero, por outro lado, é controlada pela oxidação de monômeros de 3(HB) pela enzima 3-HB- desidrogenase, a qual é inibida por acetato e NADH (BYROM, 1987). Em condições aeróbicas, a reciclagem de NAD+/NADH é obtida, principalmente, pela cadeia respiratória, que é acompanhada pela produção de vários moles ATP por moles de NADH oxidados (SHI *et al.*, 1997; YAMANE, 1993).

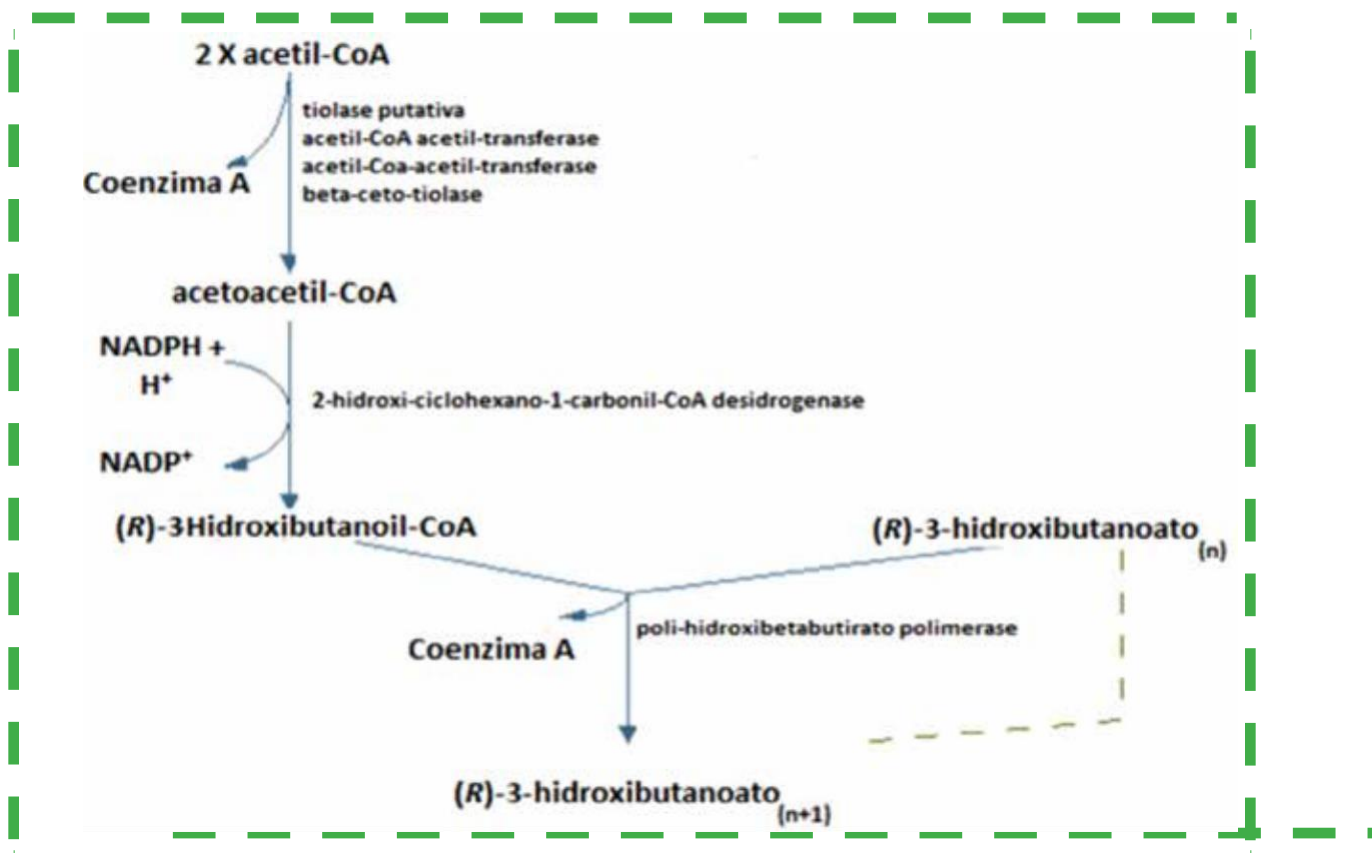
Outro gênero do grupo de *C. necator* produtor de PHA é o das *Pseudomonas*, sendo este de cadeia curta, com relação direta com o tamanho do substrato, sugerindo que a biossíntese é uma ramificação direta da beta-oxidação de ácidos graxos (Figura 8).



**Figura 8** - Rota metabólica para a biossíntese de PHAs por *Pseudomonas*.

Fonte: Adaptado de MADISON & HUISMAN, 1999.

Estes ácidos graxos em *Pseudomonas* são degradados para a remoção das unidades de  $C_2$  na forma de acetil-CoA, e o restante da rota os oxida a 3-cetoacil-CoA, via intermediários de 3-hidroxiacil-CoA. A especificidade do substrato varia de  $C_6$  a  $C_{14}$  (R)-3-hidroxiacil-CoA, com preferência a monômeros de  $C_8$ - $C_{10}$ . No entanto, em face do intermediário (S)-3-hidroxiacil-CoA da  $\beta$ -oxidação, um passo adicional é requerido para a síntese do monômero (R)-3-hidroxiacil-CoA. Tal precursor é o produto da reação da hidratase pela atividade da epimerase do complexo de  $\beta$ -oxidação, ou por uma 3-cetoacil-CoA redutase específica (HUISMAN *et al.*, 1989; LAGEVEEN *et al.*, 1988). Por outro lado, a produção do P(3HB) é característica comum também entre bactérias fototróficas anaeróbias dos gêneros *Chromatium*, *Thiocystis*, *Thiocapsa*, *Rhodococcus*, *Rhodobacter* e *Rhodospirillum*, os quais crescem sob acetato (Figura 9).



**Figura 9** - Rota metabólica para a biossíntese de poli-3-hidroxi-butanato [P3(HB)] em *Rhodobacter sphaeroides*.

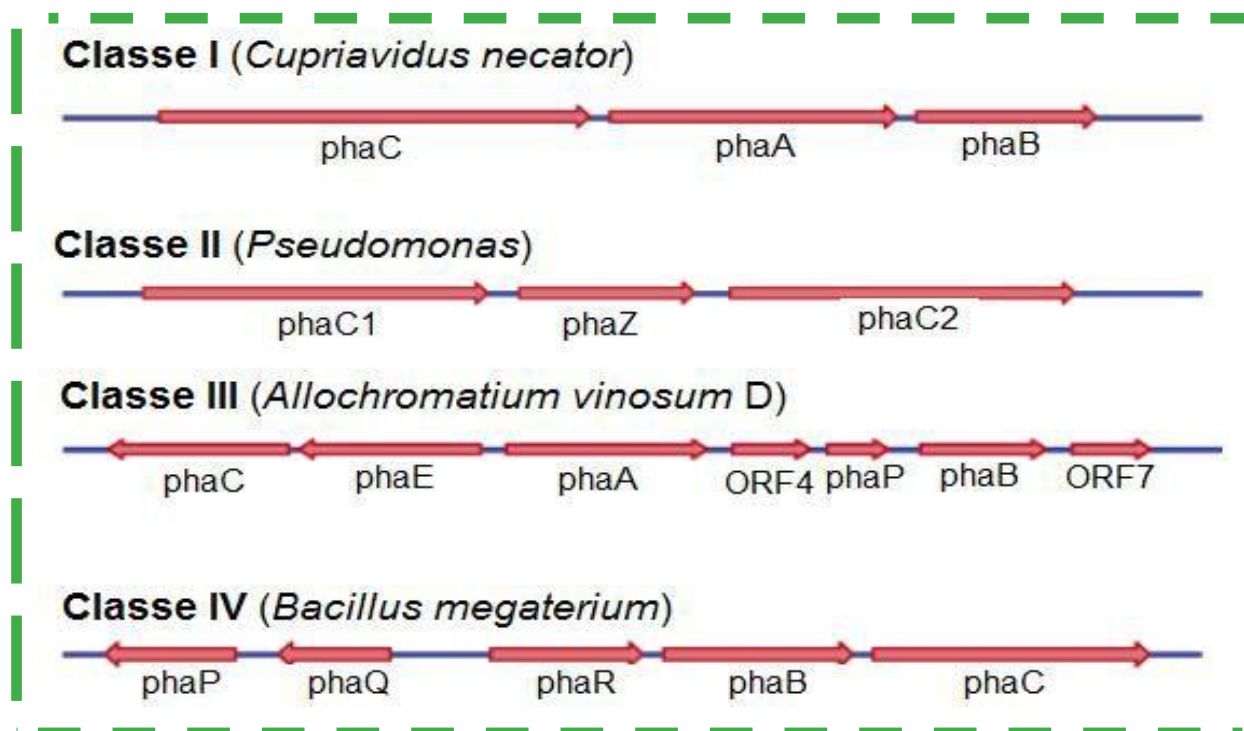
Fonte: Adaptado de BIOCYC DATA COLLECTION, 2015.

Em suma, a síntese em fototróficas se inicia a partir do acetil-CoA, numa sequência de três reações catalisadas por enzimas distintas. Primeiro ocorre a condensação do acetil-CoA pelo complexo acetil-CoA-acetil transferase/ $\beta$ -cetoacil-CoA tiolase (Phb-A), que gera acetoacetil-CoA. Em seguida, este é reduzido por uma desidrogenase dependente de NADPH (acetoacetil-CoA desidrogenase ou Phb-B), gerando (R)-3-hidroxi-butanóil-CoA, e, em seguida, o PHB é produzido pela polimerização daquele através da polimerase de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (Phb-C). Acredita-se que tal enzima permanece ligada covalentemente ao polímero durante o crescimento de sua cadeia (ESCAPA, 2012; GONZÁLEZ GARCÍA *et al.*, 2013; LÓPEZ, 2013).

A maioria dos processos de produção de PHAs utiliza substratos a base de sacarose, elevando o custo diante do rendimento obtido. Frente a isso, ao avaliarem a produtividade de uma cultura pura de *C. necator* em resíduos de alimentos fermentados, Hafuka *et al.* (2011) apontaram a necessidade de mais estudos para elevar a taxa de produção de PHB, observando que embora a técnica de melhor eficiência energética a par tir dos resíduos incluía a fabricação do biopolímero por culturas microbianas mistas, o teor de PHB final é menor (<65%) que numa cultura pura (atinge 80%).

Uma vez que as pesquisas mais recentes sobre PHAs têm focado predominantemente nas enzimas que estão diretamente envolvidas na sua síntese, e a maioria delas é bem caracterizada bioquímica e molecularmente (JENDROSSEK, 2009), os genes codantes para tais estão geralmente agrupados em operons, e podem ser encontrados em ilhas genômicas (TRIBELLI *et al.*, 2012), sugerindo-se que a transferência horizontal dos genes pha é um mecanismo de adaptabilidade dos microrganismos às condições estressantes. Desses, o gene codante da sintase (phaC) é o principal alvo para ensaios de mutação em projetos biotecnológicos que almejam elevar a produção de PHAs (REHM, 2003). Isolar microrganismos que possuam esse gene significa selecionar os potencialmente produtores de bioplásticos. O modelo atual das PHA-sintases ativas possui duas subunidades, formando um homodímero ou heterodímero, sendo classificadas em quatro classes (Figura 10).





**Figura 10** - Organizações genéticas das quatro classes dos loci pha: phaA,  $\beta$ -cetotiolase; phaB, acetoacetil redutase; phaC (inclusive phaC1 e phaC2), PHA sintase; phaE e phaR, subunidades da PHA sintase de classes III e IV, respectivamente; phaP, fasina; phaQ, repressor; phaZ, PHA depolimerase. ORF: região aberta de leitura com função desconhecida.

Fonte: Adaptado de SOLAIMAN & ASHBY, 2004.

A PHA sintase de Classe I possui apenas subunidade PhaC que atua em substratos com 3 a 5 carbonos – é o caso da PHA sintase de *C. necator*. A de Classe II também só possui subunidade PhaC, porém a enzima atua em substratos maiores, com 6 a 14 carbonos – situação encontrada em *Pseudomonas* spp. Já a de Classe III, além de PhaC, possui também PhaE (exemplo: *Allochrochromatium vinosum*); enquanto a Classe IV possui as subunidades PhaC e PhaR – é o caso do gênero *Bacillus* (REHM, 2003).

No entanto, não somente o alto custo do substrato limita a produção de PHAs em grandes quantidades. O processo envolvendo culturas puras, por exemplo, necessita de condições estéreis para o desenvolvimento e manutenção, o que é de alto valor para as empresas (AMULYA *et al.*, 2016). É necessário potencializar o processo de fermentação e as condições da cultura microbiana (temperatura, pH e velocidade do agito), conforme citado na Tabela 4. Alguns estudos inclusive apontam a clonagem de genes como sendo benéfico ao processo (TRIPATHI *et al.*, 2013).

Segundo Jiang *et al.* (2012), como proposta de tratamento de efluentes alternativa e barata está a engenharia de comunidades microbianas. Esta não requer substrato estéril ou condições operacionais onerosas, utilizando microrganismos selecionados em ambiente natural a base de águas residuais (advindas de fábricas de madeira, papel, petróleo, açúcar e resíduos urbanos), com rendimento de até 70% da massa seca em biopolímero. Esta faz uso também da estratégia de alimentação contínua, a qual impulsiona uma pressão seletiva sobre os microrganismos maximizando o sistema de produção (AMULYA *et al.*, 2016; ATLIÉ *et al.*, 2011). Para uso em escala comercial, é desejável a utilização de linhagens bacterianas que consigam aliar elevada densidade celular num curto período de tempo e grande produção do polímero a par tir de substratos de baixo custo. Assim, alguns pesquisadores têm avaliado em laboratório o uso de substratos alternativos, tais como óleos, esgoto doméstico e melão para bactérias usadas nos experimentos em frascos agitados ou em biorreatores com o propósito de obter PHAs. Wang *et al.* (2014) sumarizaram as tecnologias necessárias para a produção de linhagens bacterianas (selvagens ou modificadas geneticamente) úteis para a produção industrial desses polímeros (Tabela 5).

**Tabela 4-** Condições de cultivo para a produção de polihidroxialcanoatos (PHA) em escala laboratorial.

Bactérias	Meio de Cultura	pH	Temperatura	Agitação	Tipo de Reator	Referência
<i>Pseudomonas</i>	meio mínimo + 1% de óleo de soja	7	37°C	150 rpm	SI	Marjadi & Dharaiya, 2011.
	meio mínimo + 2% de óleo de milho	7	37°C	200 rpm	Frascos (100 mL)	Chaudhry <i>et al.</i> , 2011.
	meio mínimo + 2% de glicerol	7	30°C	220 rpm	SI	Palmeri <i>et al.</i> , 2012.
	meio mínimo + 3% de melaço	7	37°C	150 rpm	Frascos (150 mL)	Naheed <i>et al.</i> , 2012.
<i>Enterobacter</i>	meio mínimo + extrato de levedura + óleo de máquina	5.1	30°C	75 rpm	Reator (2 L)	Arumugam <i>et al.</i> , 2014.
	meio mínimo (NYB) + esgoto doméstico	7	37°C	SI	Frascos (200 mL)	Ceyhan & Ozdemir, 2011.
<i>Klebsiella</i>	meio mínimo + 5% de melaço	7	30°C	SI	Biorreator (5L)	Zhang <i>et al.</i> , 1994.
	2,5% manitol + 0,5% extrato de levedura + 1% peptona	8	35°C	estática	Frascos (20mL)	Shenoy <i>et al.</i> , 2012.
<i>Bacillus</i>	meio mínimo + 2% de sacarose	SI	30°C	250 rpm	Frascos (100 mL)	Shamala <i>et al.</i> , 2003.
	meio mínimo + 2% de sacarose	SI	37°C	140 rpm	Frascos (SI)	Narayanan & Ramana, 2012.
	meio mínimo + 2% melaço + 0,08% de ureia	7	30°C	200 rpm	Frascos (50 mL)	Kulpreecha <i>et al.</i> , 2009.
	meio mínimo + 2% de melaço	7	35°C	150 rpm	Frascos (400 mL)	Gomaa, 2014.

SI: sem informação.

Fonte: Autores, 2017.

**Tabela 5-** Tecnologias a serem desenvolvidas e que são capazes de diminuir o custo da produção de polihidroxialcanoatos (PHA).

<b>Tecnologia</b>	<b>Razão e/ou propósito</b>	<b>Metodologia</b>
Fermentação com alta densidade celular	Crescimento dos microrganismos e facilidade para recuperação dessas células	Manipulação do <i>quorum sensing</i> e mecanismos de assimilação de oxigênio
Crescimento das células em substratos de baixo custo ou substratos impuros	Os substratos contribuem com 60% do custo de produção de PHA	Seleção de substratos específicos nos quais a bactéria produza alto conteúdo de PHA
Células de crescimento rápido	Tempo de fermentação reduzido e menor risco de contaminação microbiana	Minimização do genoma bacteriano e modificações nos padrões de crescimento
Rápido crescimento de bactérias que utilizem CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> é um substrato gratuito	Manipulação do mecanismo de assimilação de CO <sub>2</sub> como dos carboxissomos
Processo de fermentação aberto (não estéril) e contínuo	Economia de energia para esterilização, redução da complexidade de fermentação e aumento da efetividade do processo	Seleção de produtores de PHA's capazes de crescer rapidamente em ambientes extremos de pH, temperatura e pressão osmótica
Síntese de PHA induzida por limitação de oxigênio	O oxigênio é um fator limitante em todo crescimento celular de alta densidade	Transferência dos operons de PHA's para regiões com promotores microaeróbicos
Acúmulo elevado de PHA (> 95% em células secas)	Evitar processos caros e complicados de purificação do polímero	Manipulação do mecanismo de síntese de PHA
Aumento do substrato para eficiência da conversão em PHA	Os substratos contribuem com 60% do custo de produção de PHA	Remoção das vias que consomem substratos para metabolismo não relacionados a PHA, e/ou reforço no fluxo de síntese do polímero
Aumento de células produtoras de PHA	Mais espaço para o acúmulo de PHA e recuperação das células	Engenharia genética dos microrganismos
Indução de floculação celular	Facilita a recuperação da biomassa após fermentação	Expressão induzível de proteínas adesivas de superfície
Lise celular induzível	Permite a recuperação dos grânulos de PHA após centrifugação da biomassa	Expressão induzível de proteínas envolvidas na lise celular
Rompimento de células por hiperprodução de PHA	Economia do processo de centrifugação da biomassa	Manipulação do mecanismo de síntese de PHA
Produção extracelular de PHA	Ausência de limitação devido ao pequeno espaço celular, além de facilidade de recuperação de grânulos	Necessidade de novos mecanismos de síntese de PHA
Grânulos grandes de PHA	Fácil recuperação dos grânulos de PHA a partir da lise na cultura	Manipulação da formação das proteínas associadas aos grânulos
Célula sintética combinando todas as propriedades acima	Elevada competitividade	Síntese de uma célula artificial com DNA funcional construído

Fonte: WANG *et al.*, 2014.

## OS DESAFIOS DO NOVO “PLÁSTICO VERDE”

Na busca por alternativas sustentáveis de energia, o poli-3-hidroxibutirato ou PHB tem sido o bioplástico do grupo dos polihidroxialcanoatos com maior potencial de substituição dos plásticos sintéticos. O custo total para sua produção, segundo Naranjo *et al.* (2014), envolve fatores como o microrganismo e as fontes de carbono e nitrogênio (matéria-prima) selecionados para o processo (rendimento e produtividade), a compatibilidade das condições de pré-tratamento do substrato com as dos processos de fermentação (temperatura ideal, arejamento e pH), separação e purificação (estes, fortes consumidores de energia durante o procedimento).



Além disso, o PHB apresenta limitações mecânicas (instabilidade térmica e fragilidade). Em função disso, estudos têm sido desenvolvidos para aprimorar a resistência desse biopolímero e o custo de sua produção, utilizando-se para tal matérias-primas baratas como resíduos agroindustriais. Dahman & Ugwu (2014) fizeram uso da palha de trigo, até então descartada, para produção de PHB. Embora a maioria dos microrganismos não a metabolize, quando hidrolisada, ela dá origem a variados monossacarídeos favoráveis ao crescimento celular e a elevada produção de PHB. Outro estudo avaliou a utilização do PHB como enchimento de reforço associado a lignina (subproduto da produção de papel, obtido a par tir da madeira), a fim de influenciar na viscosidade e cristalização do material, além de sua biodegradabilidade. Embora a atividade antimicrobiana da lignina possa ter modulado a velocidade de degradação, não foi possível observar uma significativa conexão entre a matriz e o reforço, e a combinação não afetou a estabilidade térmica (ANGELINI *et al.*, 2014). Por outro lado, utilizando resíduos de café (casca e pergaminho) a par tir do mesmo princípio de reforço de enchimento + matriz polimérica, atingiu-se estabilidade térmica e aumento da absorção de água (REIS *et al.*, 2015).



Ainda são necessários mais estudos para encontrar a melhor maneira de produzir o PHB associado a outro material, em prol de um produto final resistente e estável, de baixo custo, podendo torná-lo competitivo ao plástico convencional.

No início do segundo milênio, alguns estudos relataram a produção simultânea de polímeros distintos (não apenas precursores dos bioplásticos, mas também, polímeros de valor comercial em geral) a par tir de um mesmo lote, como uma possibilidade mais lucrativa para as biorrefinarias. Mantendo o foco nos bioplásticos, verificou-se que cepas de *Azotobacter* sp e *C. necator* foram capazes de produzir exopolissacarídeos (EPS) – polímeros extracelulares utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica, durante a síntese de PHB, além do mesmo resultado ter sido atingido a par tir de culturas de *Anabaena cylindrica* na síntese do copolímero PHB-PHV, tornando possível expandir a variedade de produtos obtidos a par tir destes microrganismos (SUKAN *et al.*, 2015).

Em 2014, Naranjo *et al.* elucidaram a vantagem da interação entre bom uso de energia de biomassa a partir dos resíduos, durante a produção de bioplásticos, biocombustíveis, solventes e outros produtos químicos naturais em biorrefinarias, utilizando casca e polpa de bananas que seriam descartadas após a seleção para comercialização. Reduziram o gasto de água e energia em 35 e 30% respectivamente, além do custo total durante a produção de quase 15% somado a considerável diminuição de impactos ao meio ambiente.

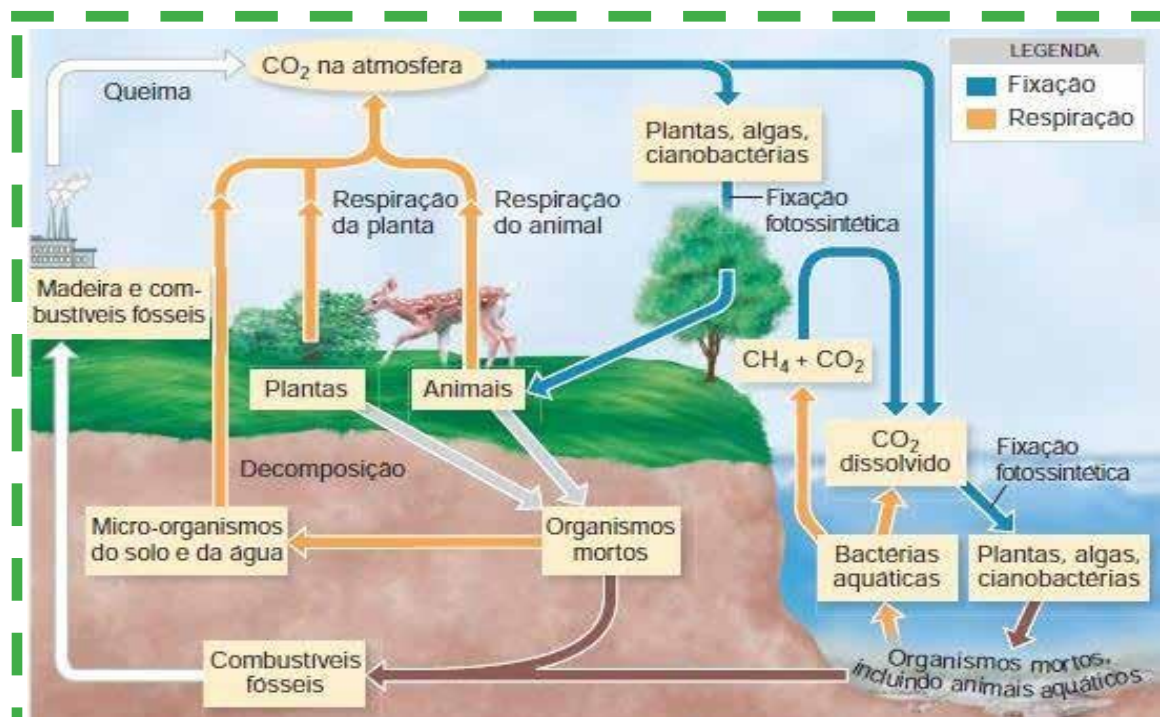


# 3

## BIOCOMBUSTÍVEIS LÍQUIDOS E BIOHIDROGÊNIO

Nas últimas décadas, sobreveio o debate global em torno das ações antrópicas precursoras do cenário climático atual, e o que é estimado a longo prazo. Consta-se que o uso de combustíveis fósseis prejudica intensa e completamente muitas gerações. A emissão de gases de efeito estufa (GEE), isto é, monóxido (CO) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>), óxidos de enxofre (SO<sub>x</sub>) e de nitrogênio (NO<sub>x</sub>) e hidrocarbonetos voláteis, está fortemente ligada ao setor de energia que, por sua vez, tem na atividade de transporte a maior emissora de GEE. Espera-se que as nações possam desenvolver juntas ações de mitigação acerca das projeções das emissões desses gases, e, posteriormente, alcançar a harmonia viável entre o desenvolvimento da eficiência energética e sustentabilidade.

Considerando que o CO<sub>2</sub> é o gás mais emitido ao longo de todo ciclo de vida de um combustível fóssil, o quadro de emissões de GEE é expresso sob a forma de equivalentes de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2eq</sub>), e fatores como densidade demográfica e tamanho das nações interferem na demanda direta de combustível fóssil, bem como no tratamento e descarte dos resíduos, além das emissões de CO<sub>2eq</sub>, como no caso das incinerações (GAZZONI, 2012). O que vai determinar o volume das emissões, portanto, será o volume do despejo e seu respectivo manejo (BRASIL, 2013).



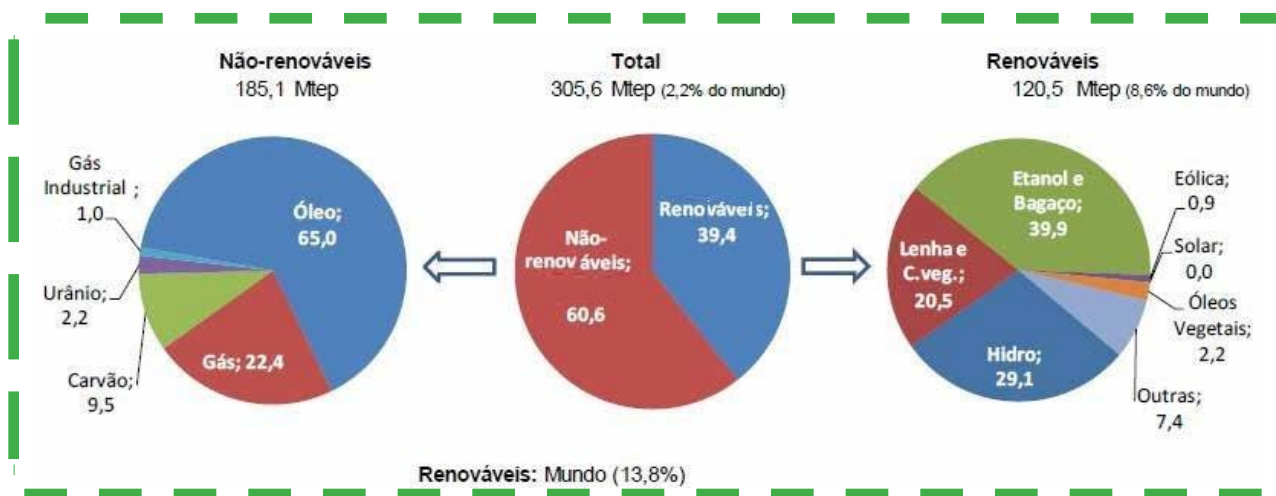
**Figura 11** - Ciclo do carbono. Numa escala global o retorno do CO<sub>2</sub> para atmosfera pela respiração equilibra sua remoção pela fixação. Entretanto, queima de madeira e combustíveis fósseis adiciona mais CO<sub>2</sub> à atmosfera, elevando sua concentração constantemente.

Fonte: TORTORA *et al.*, 2012.

Dados do balanço energético (BEN) de 2013 revelaram que o setor de transportes brasileiro é responsável pelo consumo de 32% dos combustíveis fósseis, correspondendo a um equivalente de emissões de CO<sub>2</sub> de 215,3 milhões de toneladas (EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA, 2014). Tendo em vista que o Brasil representa apenas 2% do consumo energético mundial, devido a compensação por sua produção de biocombustíveis, tais números ainda não são significativamente negativos ao meio ambiente quando comparado ao de outros países (MOTA & MONTEIRO, 2013).

A Lei nº 12.187/2009 estabeleceu o compromisso nacional voluntário em prol da redução da emissão de GEE, iniciando-se a Política Nacional sobre Mudança do Clima (PNMC) (BRASIL, 2013). Estima-se que em 2035 os biocombustíveis brasileiros irão suprir um terço da demanda doméstica para o transporte, e 40% das exportações líquidas no comércio mundial (IEA, 2013).

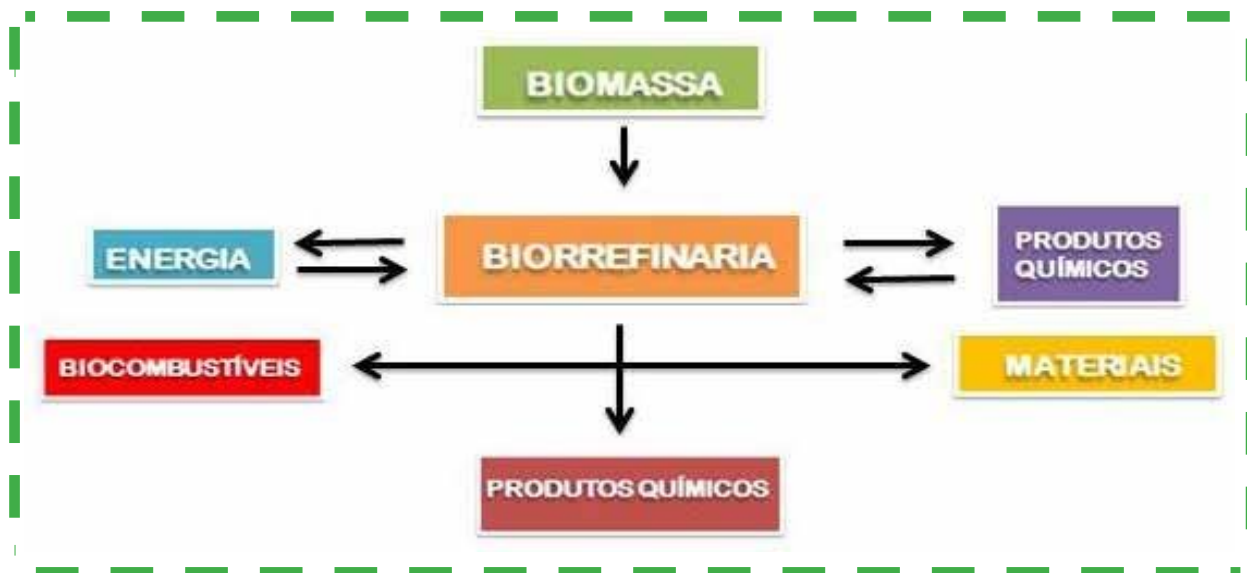
Em função da geografia, clima e vasta disponibilidade de recursos, o Brasil tornou-se pioneiro na produção de energia renovável, como é o caso do bioetanol, visto não requerer equipamentos ou matérias-primas importadas para tal, como no caso das energias eólica e solar. Em 2014, os valores acerca da geração de energia renovável e não renovável no país atingiram respectivamente 39,4% e 60,6% (EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA, 2015), demonstrando o quanto sua matriz energética é diversificada.



**Figura 12** - Oferta interna de energia no Brasil (%). Mtep = milhões de toneladas equivalentes de petróleo. Fonte: EPE (Empresa de Pesquisa Energética), 2015.

Assim, nos próximos 50 anos os biocombustíveis [biohidrogênio (H<sub>2</sub>), etanol e bio-metano] serão as formas mais promissoras de fornecimento de energia. Atualmente, o bioetanol é produzido a partir da cana-de-açúcar, do milho, do sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], do trigo (*Triticum aestivum* L.), da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), da batata-doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] e de outras fontes vegetais, enquanto o biodiesel é gerado a partir de óleos de sementes de colza (*Brassica napus* L.), palma (*Elaeis guineensis* Jacq.), soja [*Glycine max* (L.) Merr.], girassol (*Helianthus annuus* L.), algodão (*Gossypium hirsutum* L.), babaçu [*Orrbignya speciosa* (Mart.) Barb. Rodr.], amendoim (*Arachis hypogaea* L.), mamona (*Ricinus communis* L.) e de gorduras animais. Portanto, um dos impactos negativos com o aumento crescente da produção de biocombustíveis de 1ª geração (117,715 milhões de litros em 2013) a partir dessa matéria prima é a exploração do solo (vastas áreas destinadas a produção da matéria prima), além da competição por recursos que servem de alimentos (KOIZUMI, 2015). Com isso, biocombustíveis de 2ª geração provenientes de resíduos e biomassa lignocelulósica, composta por celulose (unidades de glucose), hemicelulose (polímeros de açúcar) e lignina (polímeros complexos), desafiaram a descoberta de um caminho factível para degradar esse material em glicídeos simples (MACHADO & ATSUMI, 2012) e passaram a ser valorizados.

Um exemplo é o “Projeto Bioetanol” que, iniciado em 2006 e financiado pela FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos), busca a produção de bioetanol a partir da hidrólise enzimática da biomassa de cana-de-açúcar, já que, durante a produção convencional de açúcar e etanol, apenas um terço da massa dessa planta é aproveitada. Assim, com a finalidade de minimizar a expansão dos canaviais, a meta é utilizar tecnologias de conversão da celulose do bagaço e da palha da cana, ainda que seja um desafio em função da estrutura lignocelulósica. Por esta razão, é necessário que a biomassa passe por um pré-tratamento visando separar a matriz de lignina (OGEDA & PETRI, 2010).



**Figura 13** - Fluxograma da conversão de biomassa em biocombustíveis, insumos químicos, materiais, alimentos, rações e energia. Melhor aproveitamento de matéria-prima e redução de efluentes. Rotas de conversão: mecânica, bioquímica, microbiana, química e termoquímica.

Ainda que viável, a valorização de biomassa advinda de resíduos agroindustriais para produção de biocombustíveis de 2ª geração apresenta dificuldades a serem superadas. Sua heterogeneidade (diferenças em propriedades físicas e químicas) torna a conversão complexa, inclusive em termos de metodologias, sendo a torrefação a temperaturas capazes de clivar ligações químicas de polímeros orgânicos, em especial de resíduos já oriundos de algum processamento, a solução para muitos dos casos (DUCA *et al.*, 2014). A biotransformação dos resíduos resultantes através de microrganismos (bactérias, fungos e microalgas), representa a continuidade do desenvolvimento de eficiência energética e sustentável em biorrefinarias, pois estas podem gerar diferentes produtos a par tir de uma mesma matéria-prima, reduzindo custos, agregando valor à inovação, aumentando o lucro e evitando flutuações de mercado do preço de um único produto (ALVIM *et al.*, 2015).

As algas e bactérias fotoautotróficas sintetizam biocombustíveis através de CO<sub>2</sub> e luz solar, alcançando grandes taxas de crescimento em sistemas de produção menos complexos, como áreas degradadas e compactadas. Contudo, nestes é preciso aperfeiçoar a coleta e isolamento de produtos, bem como compreender a capacidade fotossintética envolvida para um melhor rendimento (MACHADO & ATSUMI, 2012). Os demais microrganismos (heterotróficos), por outro lado, devem ser capazes de converter em biocombustíveis uma variedade de moléculas, como ácidos orgânicos, glicídios, etc. Por tanto, o pré-tratamento da biomassa pode afetar a capacidade produtiva dos microrganismos selecionados. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, embora não seja capaz de consumir pentoses como a xilose presente em material proveniente de paredes vegetais, é amplamente utilizada na produção de bioetanol (HUFFER *et al.*, 2012).

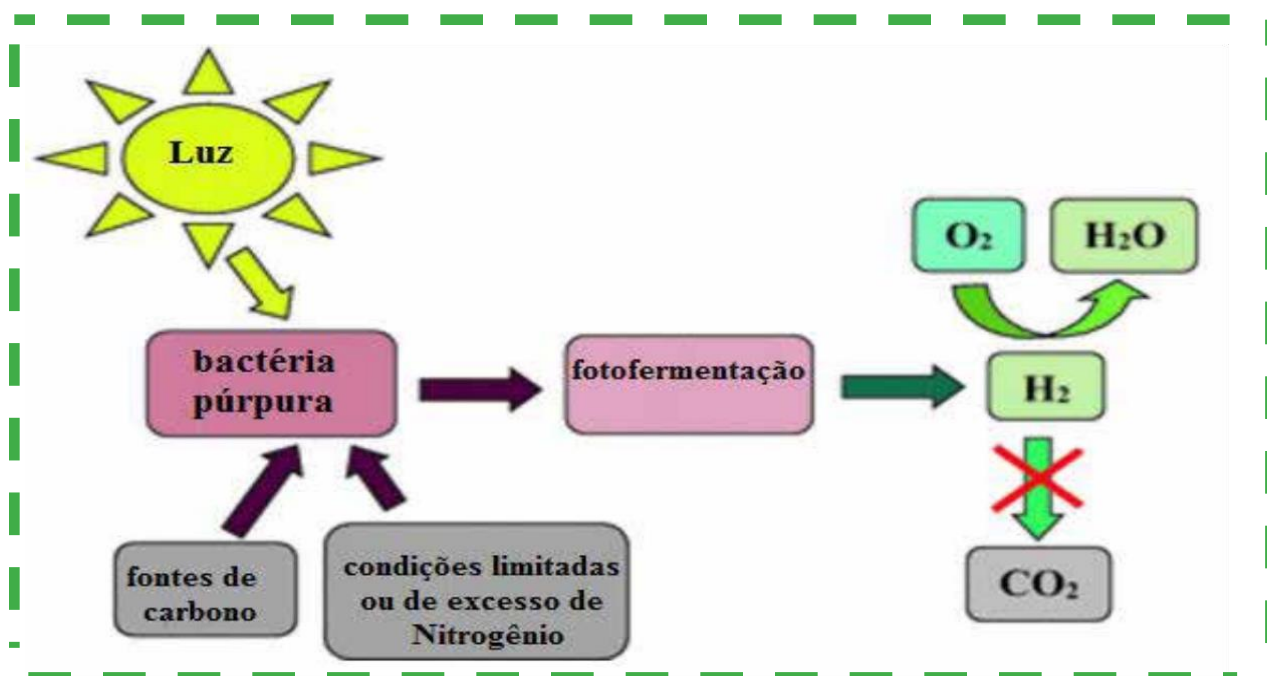
Misturas complexas de substratos podem não ser interessantes para produção industrial de biocombustíveis, já que alguns microrganismos utilizam a repressão catabólica de carbono para regular seu uso, isto é, na presença de uma fonte de preferência, ocorre a supressão da expressão de genes necessários a absorção das demais, exigindo



ANA MARIA QUELJEIRO LÓPEZ | ANNA KAROLINE AZEVEDO FARIAS | AMANDA LYS DOS SANTOS SILVA | ELANE CRISTINA LOURENÇO DOS SANTOS um período maior para o consumo completo destas, como ocorre com *Escherichia coli*, por exemplo. A engenharia metabólica, portanto, visa elevar a expressão de enzimas que possam canalizar um maior fluxo de carbono (HUFFER *et al.*, 2012).

Assim, variados tipos de biocombustíveis (ou precursores), como derivados de álcoois, ácidos graxos, isoprenóides e policetídeos, estão sendo produzidos por microrganismos geneticamente modificados. Dentre os álcoois, merece destaque o isobutanol e butanol, sendo o último também produzido por bactérias selvagens do gênero *Clostridium*. A comercialização destes avançou em empresas como Gevo, Butalco e Butamax Advanced Biofuels. Isso mostra como a biologia sintética e de sistemas pode aprimorar a engenharia metabólica de microrganismos a fim de produzir compostos cada vez mais complexos sem a necessidade de ajustes de vias metabólicas (FÁVARO, 2012).

No entanto, embora tais combustíveis sejam atrativos, a atenção para a produção de energia sustentável está atualmente voltada para o gás hidrogênio ( $H_2$ ). Este é oriundo de um dos elementos mais abundantes do universo, e sua combustão gera apenas água e produz elevada quantidade de energia (~ 140 MJ / kg, isto é, pelo menos 3 vezes mais do que o obtido com a combustão de gás e de derivados de hidrocarbonetos naturais) (TRCHOUNIAN, 2015; TRCHOUNIAN & TRCHOUNIAN, 2015). A produção mundial de  $H_2$  em larga escala, atualmente, está acima de 50 milhões de toneladas anuais, sendo eminentemente eletroquímica e derivada de combustíveis fósseis. Porém, o crescente consumo e a fabricação de veículos movidos a  $H_2$  requerem mais esforços para aumentar sua produção biológica e diminuir os custos desta, tornando-a competitiva (TRCHOUNIAN & TRCHOUNIAN, 2015), a partir da fotólise da água (por meio de algas e cianobactérias), da fotodecomposição (por bactérias fotoheterotróficas) (Figura 14) da fermentação anaeróbica (bactérias quimioheterotróficas), além de sistemas híbridos fotossintéticos e fermentativos (Figura 15). Tais bioprocessos (Tabela 6), em especial os três últimos, têm gerado resultados promissores que também contribuem para o tratamento de resíduos poluentes (BASAK *et al.*, 2014; De SÁ *et al.*, 2014; SHOW *et al.*, 2011).

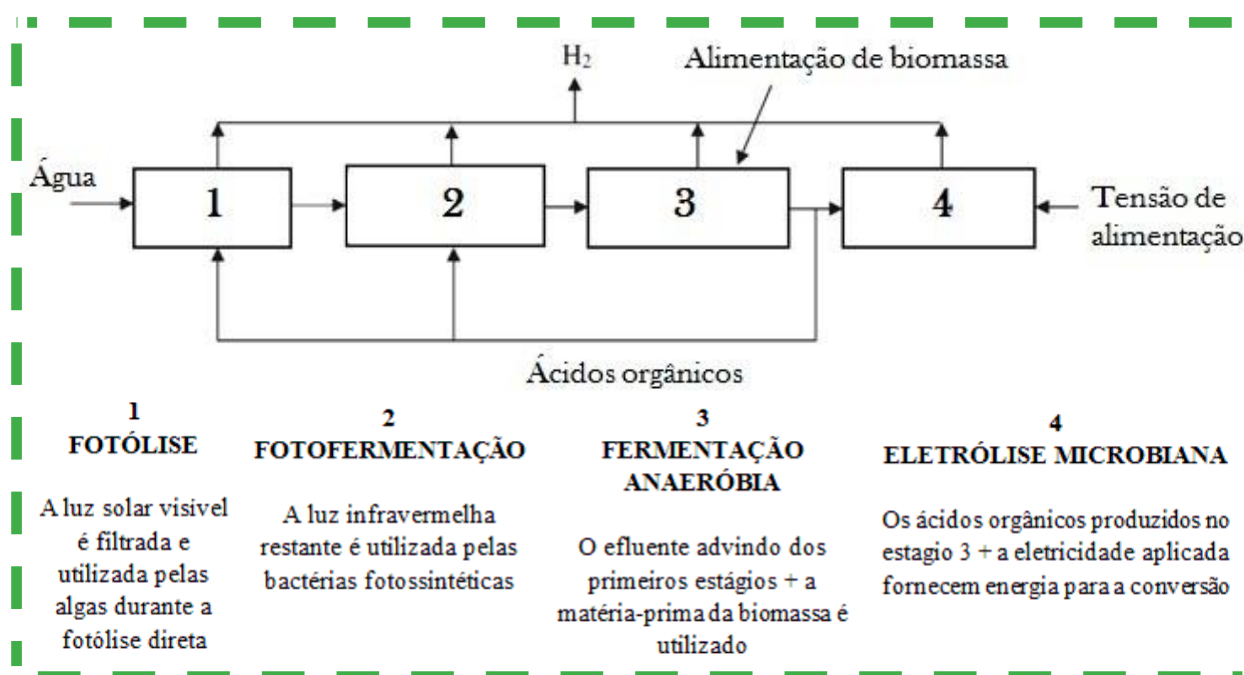


**Figura 14** - Produção de  $H_2$  por bactérias púrpuras durante fotofermentação de fonte de carbono como lactato, etc, sob luminosidade ( $C_3H_6O_3 + 3H_2O + luz \rightarrow 6H_2 + 3CO_2$ ;  $\Delta G = + 8.5 \text{ kJ/mol } H_2$ ).

**Tabela 6** - Vantagens, desvantagens de processos biológicos e principais microrganismos estudados para a produção de biohidrogênio.

Processos biológicos	Vantagens	Desvantagens	Micro-organismos
Biofotólise direta	Produção de H <sub>2</sub> a partir da água; Não necessita de ATP.	Necessita de iluminação constante; Inibição das hidrogenases pelo O <sub>2</sub> ; Biorreatores modificados para maximizar a utilização da energia solar.	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Platymonas subcordiformis</i>
Biofotólise indireta	Produção de H <sub>2</sub> a partir da água; Habilidade de fixação de N <sub>2</sub> e produção de H <sub>2</sub> pelas nitrogenases; Separação espacial do O <sub>2</sub> e H <sub>2</sub> nas células diferenciadas (heterocistos); Separação temporal (dia/noite) em células não-heterocísticas.	Necessita de iluminação constante; Biorreatores modificados para maximizar a utilização da energia solar; Necessidade de ATP pelas nitrogenases; Síntese e manutenção dos heterocistos; CO <sub>2</sub> presente no gás.	<i>Plectonema boryanum</i> <i>Anabaena siamensis</i> <i>Anabaena variabilis</i> <i>Synechocystis</i> sp. <i>Cyanothece</i> sp. <i>Nostoc</i> sp.
Foto-fermentação	Utilização de diferentes resíduos e efluentes como substrato; Utilização de amplo espectro de luz pelas bactérias fotossintéticas.	Necessita de iluminação; Biorreatores modificados para maximizar a utilização da energia solar; CO <sub>2</sub> presente no gás.	<i>Rhodospseudomonas palustris</i> <i>Rhodobacter</i> sp. <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Rhodobacter capsulatus</i>
Fermentação anaeróbia	Ampla variedade de fontes de carbono como substrato; Não necessita de iluminação; Produção de metabólitos intermediários de grande valor agregado; Não há limitações com relação ao O <sub>2</sub> .	Tratamento do efluente após fermentação; CO <sub>2</sub> presente no gás.	<i>Clostridium</i> sp. <i>Clostridium butyricum</i> <i>Clostridium beijerinckii</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>

Fonte: De SÁ et al., 2014.



**Figura 15** - Sistema de biorreator com múltiplos estágios.

Fonte: Adaptado de SHOW et al., 2011.

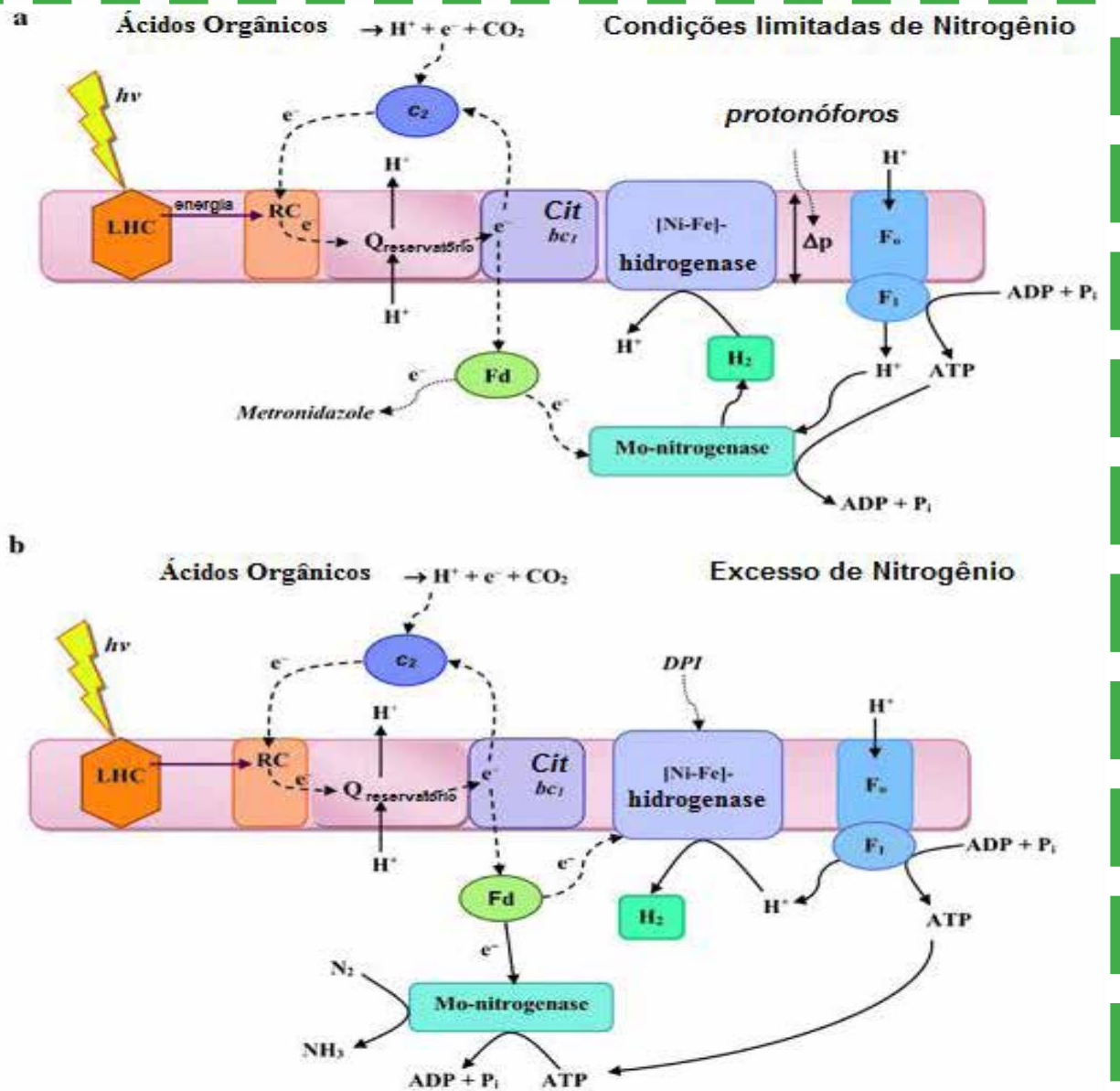
Nos biorreatores de múltiplos estágios (Figura 15), assim como num reator convencional, que apresenta recipientes (tanques ou tubos) que mantêm a cultura do microrganismo submetida ao processo em questão (fotólise, foto-fermentação, fermentação anaeróbia ou eletrolise microbiana) enquanto é alimentada pelo substrato específico

ANA MARIA QUELJEIRO LÓPEZ | ANNA KAROLINE AZEVEDO FARIAS | AMANDA LYS DOS SANTOS SILVA | ELANE CRISTINA LOURENÇO DOS SANTOS durante a etapa inicial, há produção de acetato, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. Estes passam de um tanque para outro, operado por outro processo específico (novamente fotólise, foto-fermentação, fermentação anaeróbia ou eletrólise microbiana), e o substrato residual não aproveitado em um reator, é convertido em mais CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>, seguindo essa sequência até o reator final, com melhor rendimento. Um biorreator tem de basear-se nas várias condições das culturas necessárias aos processos (velocidade de agitação das misturas, temperatura, pH, teor de sais, reciclagem de nutrientes, modo de aplicação de luz quando necessária, formação de produtos secundários, etc.) (Das NEVES, 2009; SHOW *et al.*, 2011).

No caso das bactérias fotoautotróficas ou fotoheterotróficas, o mecanismo de absorção da energia luminosa para fixação e conversão de CO<sub>2</sub> (única fonte de carbono celular) em matéria orgânica, envolve apenas um fotossistema, com um de dois tipos básicos de centro de reação fotoquímica (CRF). O CRF tipo I (feofitina-quinona) envolve a transferência de elétrons da feofitina (Pheo) para uma quinona e o tipo II (Fe-S), em que ocorre o fluxo de elétrons para um centro ferro-enxofre através de uma quinona. As bactérias púrpuras, por exemplo, apresentam CRF tipo II, e a excitação do fotossistema pela luz promove um fluxo cíclico de elétrons. A absorção dos fótons de luz dirige os elétrons do CRF (P870), através de uma cadeia de carreadores de elétrons passando por um complexo citocromo bc1 e pelo citocromo c2, retornando ao CRF. Durante o fluxo de elétrons pelo citocromo bc1, há um bombeamento de prótons, gerando um gradiente quimiosmótico e uma força próton-motriz, que promoverá a síntese de ATP (fotofosforilação). Em comparação com algas, menos energia luminosa é necessária pelas bactérias fotossintetizantes para produzir H<sub>2</sub>, principalmente devido ao elevado rendimento de conversão de substratos orgânicos ao produto, a não produção de O<sub>2</sub>, a capacidade de absorver luz de comprimento de onda mais longo e de utilizar uma ampla gama de substratos orgânicos reduzidos como fonte de carbono e elétrons, auxiliando também no processo de biorremediação (BASAK & DAS, 2007).

Fotoheterotróficas púrpuras não sulfurosas, como *Rhodobacter capsulatus* e *R. sphaeroides*, apresentam relação entre os metabolismos de carbono e nitrogênio, e esse está intimamente associado com o controle intracelular do equilíbrio de oxidação-redução (redox). Nestas, observa-se níveis máximos das enzimas chave da via de Calvin-Benson-Bassham (CBB), ou seja, da ribulose bifosfato carboxilase 1,5-/oxigenase (RuBisCO) e da fosforibulocinase (PRK). Crescimento fotoheterotrófico durante a fixação de N<sub>2</sub> resulta em menores, mas ainda substanciais, níveis de RUBISCO e PRK. No entanto, sob tais condições, a via CBB trabalha principalmente para ajudar a manter o equilíbrio redox da célula (Figura 16), por permitir que o CO<sub>2</sub> ou dimetilsulfóxido (DMSO) ou tetrimetilamina-N-óxido (TMAO) sirvam como transportadores de elétrons, através do sistema DMSO molibdênio-redutase (DorA), localizado no periplasma, e que envolve o citocromo-DorC. Este é importante especialmente quando as fontes de carbono presentes estão reduzidas (PAOLI, VICHIVANIVES & TABITA, 1998).

O complexo enzimático Nitrogenase conduz a redução biológica de N<sub>2</sub> a amônia. Resumidamente, dois componentes protéicos são necessários para tal atividade – a MoFe-proteína (ou dinitrogenase), que contém o sítio ativo para a redução de N<sub>2</sub>, e a Fe-proteína (ou redutase dinitrogenase), cuja função principal é o de transferir elétrons para MoFe-proteína com a concomitante hidrólise de Mg-ATP. Em algumas outras condições, quando nenhum amoníaco mas N<sub>2</sub> está presente no ambiente (crescimento N<sub>2</sub>-dependente), o sistema de MoFe-proteína é sintetizado para catalisar a redução desse gás para amônia, acompanhada pela redução de prótons a H<sub>2</sub>. Esta via requer muito poder redutor, e é um processo intensivo de energia (20 a 30 mol de Mg-ATP para a redução de 1 mol de N<sub>2</sub>), desempenhando não apenas um papel primário no metabolismo de N<sub>2</sub> (KERN *et al.*, 1998), mas também na homeostase redox, não sendo de estranhar que este processo seja rigorosamente regulado a nível da transcrição e pós-tradução. A escuridão ou a adição de amônio em culturas de *R. capsulatus* ou *R. sphaeroides* causa rápido decréscimo (2 a 3 min) na atividade da nitrogenase. A recuperação total da taxa inicial de atividade da nitrogenase é observada dentro de um período relativamente curto e que depende da quantidade de amônio adicionada. Os efeitos de modificação de Fe-proteínas e adições de amônio sobre a atividade de nitrogenase são diferentes, dependendo do grau de limitação de N<sub>2</sub> (Figura 16).

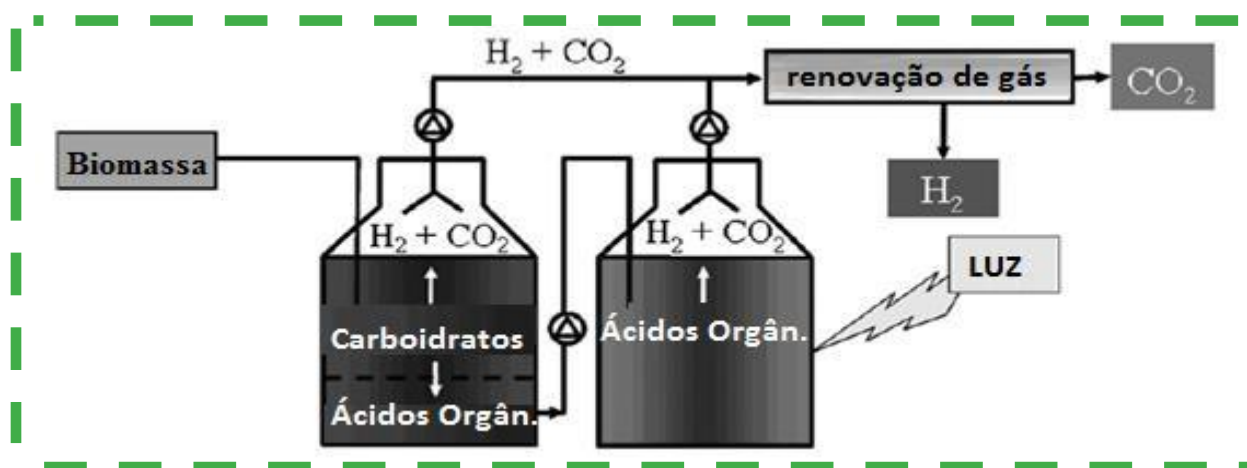


**Figura 16** – Proposta de vias envolvidas no metabolismo de H<sub>2</sub> em bactéria fotoheterotrófica *Rhodospira rubra*, sob condições limitantes (a) ou de excesso (b) de nitrogênio ( $2e^- + 2H^+ + 4ATP \rightarrow H_2 + 4ADP + 4P_i$  por mol de N<sub>2</sub>). LHC= complexo de coleta de energia luminosa, RC = centro de reação, Q= ubiquinona, Fd = ferredoxina, Cit= citocromo, DPi=força próton motriz, Pi= fosfato inorgânico.

Este tipo de regulação, denominado efeito “nitrogenase desliga/liga” (modulação reversível), pode ser parcialmente mediado por um sistema de duas enzimas: dinitrogenase redutase (Fe-proteína)-ADP- ribosiltransferase (DraT) e glicohidrolase dinitrogenase(DraG) ativando redutase (resistência), o que provoca uma modificação covalente/demodificação da Fe-proteína via ADP-ribosilação. Crescimento fotoheterotrófico sob condições de baixas concentrações de fonte de nitrogênio (como exemplo, o glutamato), sinaliza a célula para sintetizar o sistema de Mo-dinitrogenase (LUDDEN & ROBERTS, 1995). Os equivalentes redutores em excesso gerados pela oxidação de substratos de carbono são consumidos pela redução de prótons e consequente evolução de H<sub>2</sub> por uma atividade semelhante do sistema dinitrogenase. Assim, em *R. capsulatus*, por exemplo, fixação de N<sub>2</sub> é controlada por fatores ambientais, como disponibilidade de molibdênio, luz e oxigênio.

Além de produzirem hidrogênio na presença de luz, bactérias fotoheterotróficas também fermentam e produzem  $H_2$  no escuro. Carboidratos fermentados por *R. capsulatus* no escuro rendem no máximo 33% de hidrogênio, gerando como subprodutos também acetato e butirato (ABO-HASHESH & HALLENBECK, 2012a; HALLENBECK, 2009, 2012). Estes, por sua vez, podem ser posteriormente completamente oxidados a  $H_2$  e  $CO_2$  na presença de luz (fotofermentação). Na hidrólise de polissacarídeos, por exemplo, são formados os monossacarídeos que irão ser degradados, por meio da homo ou heterofermentação, em piruvato e/ou álcoois, que, posteriormente, serão convertidos em metabólitos intermediários de alto valor agregado. Tal oxidação gera elétrons que se distribuem de forma a manter a neutralidade, e o cátion hidrogênio ( $H^+$ ) atuando como acceptor final de elétrons, que na ausência de oxigênio será reduzido a ( $H_2$ ). O processo de dupla fermentação (Figura 17), por tanto, é atraente para a conversão total de matérias-primas que são apenas parcialmente oxidados durante a fermentação no escuro (ADESSI *et al.*, 2012; HALLENBECK, 2011, 2012; HALLENBECK *et al.*, 2012; KESKIN & HALLENBECK, 2012a), e vários sistemas estão sendo pesquisados, incluindo co-cultura em dois estágios com bactérias anaeróbias fermentantes, e este rende  $H_2$  adicional (5–7 moles  $H_2$ /mol de hexose) (CLAASSEN & DE VRIJE, 2010; CLAASSEN *et al.*, 2010; ÖZGÜR *et al.*, 2010).

Özkan *et al.* (2012) relataram a produção de hidrogênio por *R. capsulatus* YO3 (hup) em um fotobiorreator (4 L) em painel de vidro mantido externamente sob luz solar e alimentado diariamente (10% do volume) com usando efluente termofílico da fermentação no escuro de suco de beterraba (pela bactéria termófila *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*) no verão de 2009 de Ancara, Turquia. O efluente continha acetato (125 mM) e  $NH_4$  (7,7 mM) como as principais fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, e foi diluído três vezes com tampão fosfato de potássio, ajustando-se a concentração de acetato para 40 mM e suplementando-se com Fe e Mo. A temperatura de arrefecimento foi controlada por recirculação de água fria através de um tubo no interior do reator, obtendo-se uma produtividade de 1,12 mmol  $H_2$ /L/h e rendimento molar de 77% do máximo teórico sobre o substrato consumido ao longo de 15 dias de operação.

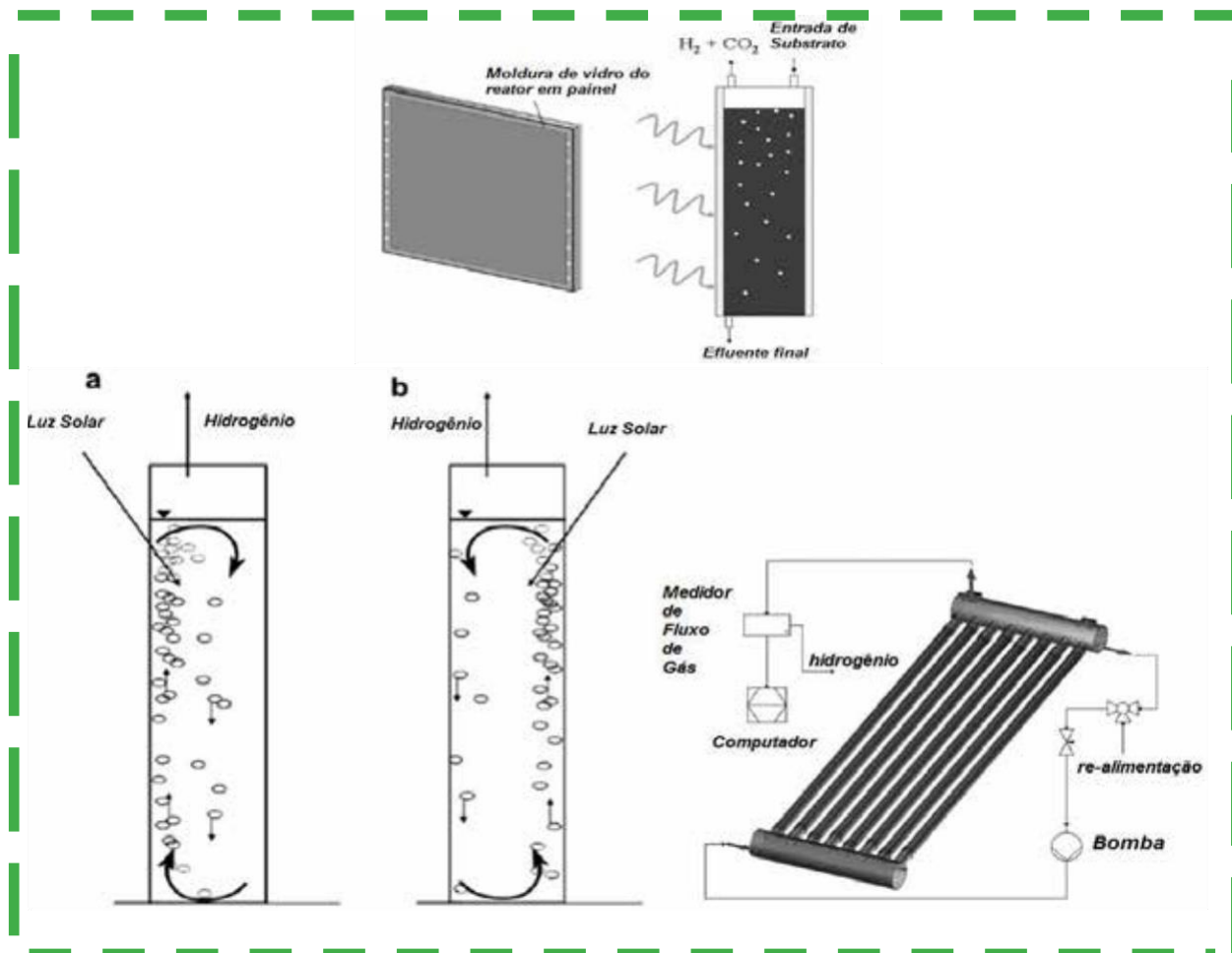


**Figura 17** - Esquema do sistema de produção de gás Hidrogênio registrado como "HYVOLUTION".

Fonte: GEBICKI *et al.*, 2010.

Gebicki *et al.* (2010), por sua vez, desenvolveram e estudaram a produção de  $H_2$  em fotobiorreatores de vidro em painel e tubular (sistema HYVOLUTION) inoculados por *R. capsulatus*, em batelada, uma vez que cada um desses tipos é mais indicado para uma situação geográfica diferente (Figura 18). O reator em painel é mais adequado quando se tem grandes áreas de solo em baixas temperaturas e, por conseguinte, desenvolvido para a aplicação no norte da Europa Ocidental. Por outro lado, o reator tubular é fácil de arrefecer e, assim, indicado para o Sul da Europa. Ambos os reatores foram pesquisados no verão sob condições ambientais da Alemanha, demonstrando-se que os dois podem ser operados durante várias semanas com produtividades comparáveis de  $H_2$ , isto é, em painel de vidro

a produtividade foi de 3690 mL H<sub>2</sub>/ m<sup>2</sup> de superfície irradiada por dia, e em túbulos de vidro esta foi de 3350 mL H<sub>2</sub>/m<sup>2</sup> de superfície irradiada por dia. No entanto, em termos de área, a superfície exigida para 8 m<sup>2</sup> de superfície irradiada do fotorreator em painel foi de cerca de 1 m<sup>2</sup> de solo, enquanto a relação da área de instalação do fotorreator tubular por área de solo é de aproximadamente 1: 1.

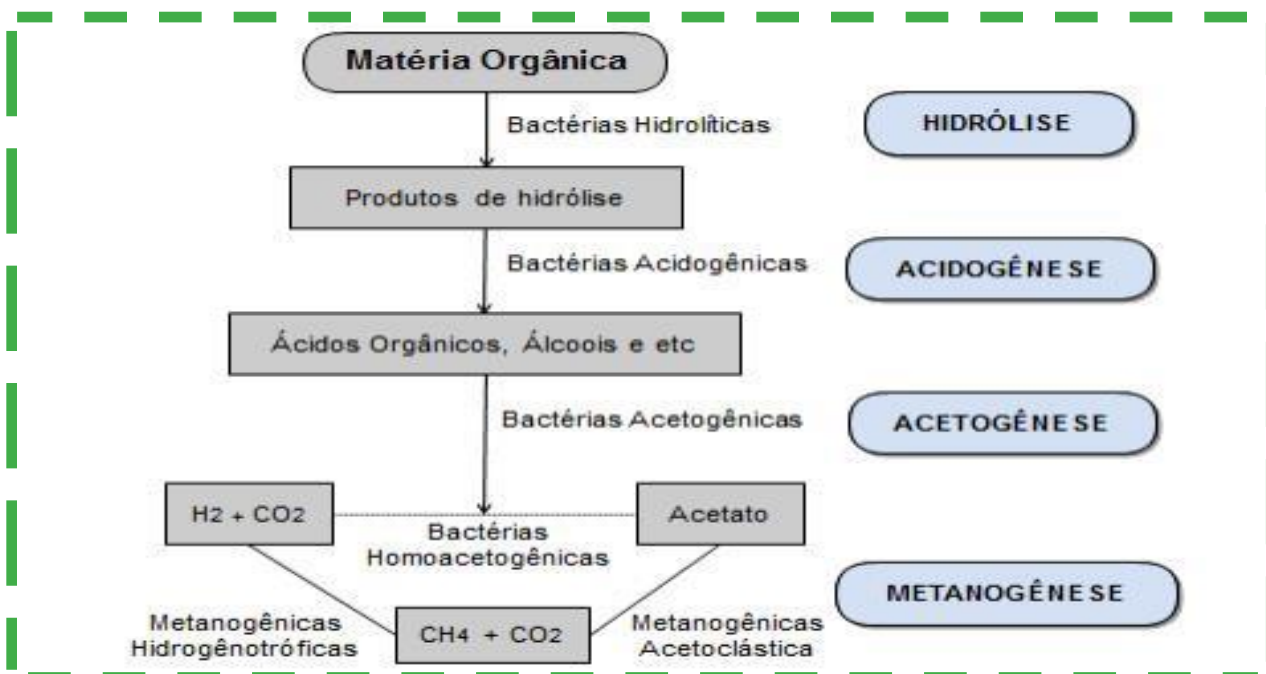


**Figure 18** - Esquemas do módulo de um fotorreator em painel de vidro (superior) exposto à luz solar, e da circulação interna da suspensão bacteriana em módulos de fotorreator tubular (abaixo, esquerda), bem como do próprio complexo fotorreator tubular (abaixo, direita) “HYVOLUTION”.

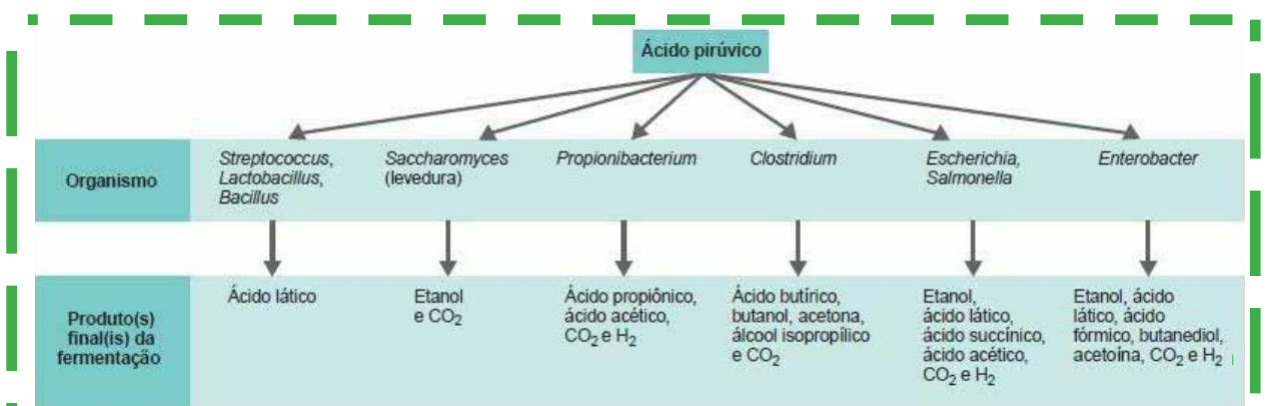
Fonte: GEBICKI *et al.*, 2010.

No entanto, tendo a fermentação anaeróbia menor limitação diante de outros processos (não depende da área de superfície de luz ou O<sub>2</sub>, por exemplo), há de se sumarizar seu mecanismo, isto é, a oxidação/ degradação de polissacarídeos, proteínas e lipídeos, admitindo-os como provenientes de resíduos, resulta em compostos mais simples além da liberação de energia (Figuras 19 e 20).

As bactérias empregadas em tal processo podem ser anaeróbias estritas ou facultativas (Figura 20), e embora as anaeróbias estritas sejam mais produtivas (4 moles de H<sub>2</sub> por mol de glicose, por exemplo), as anaeróbias facultativas são menos sensíveis a presença do O<sub>2</sub>, e dessa forma estas podem retomar a produção de H<sub>2</sub> mesmo após danos acidentais causados pela presença de O<sub>2</sub>, esgotando-o no seu meio (Das NEVES, 2009). Algumas das bactérias comumente utilizadas nesse processo podem ser encontradas no ambiente (solo, lama, adubo, água residual), como espécies dos gêneros *Clostridium*, *Citrobacter* e *Enterobacter*, além da enterobactéria *E. coli* (De SÁ *et al.*, 2014; SINHA & PANDEY, 2011).



**Figura 19** - Fluxograma das etapas do processo de degradação anaeróbia de materiais orgânicos por culturas mistas. Fonte: De SÁ *et al.*, 2014.



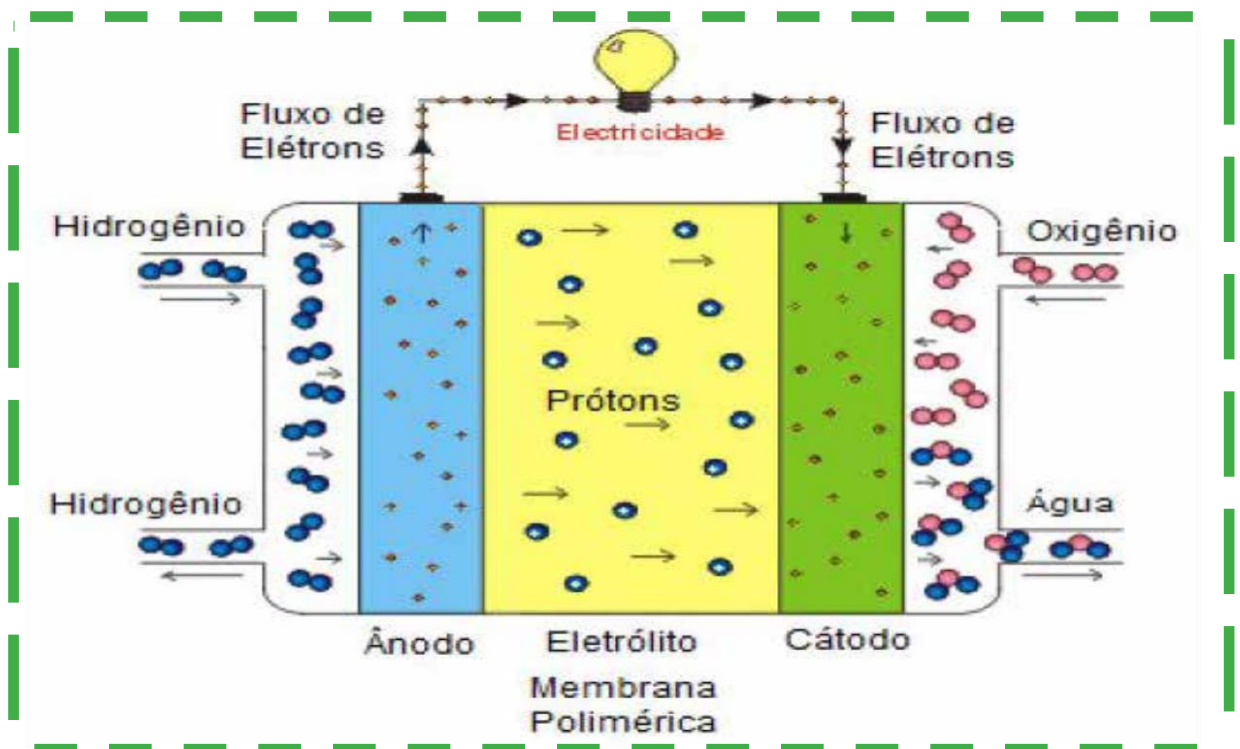
**Figura 20** - Gêneros de alguns microrganismos que produzem diferentes resíduos orgânicos a partir de glicose, e que podem ser utilizados em processos fermentativos de produção de H<sub>2</sub>. Fonte: TORTORA *et al.*, 2012.

De maneira geral, assim como na fotofermentação anóxica, a produção fermentativa anaeróbia do biohidrogênio envolve a expressão de hidrogenases e nitrogenases por meio de processos complexos que envolvem outras enzimas/ proteínas auxiliares e de maturação, sob influência do pH, tipo e concentração de inóculo e substrato. Esse processo, portanto, requer um pré-tratamento do inóculo, a fim de eliminar a contaminação por outros microrganismos consumidores de hidrogênio (Das NEVES, 2009; De SÁ *et al.*, 2014; Dos SANTOS *et al.*, 2012; SINHA & PANDEY, 2011).

Estudos indicam também que as vias biossintéticas de H<sub>2</sub> são sensíveis a elevadas concentrações deste, ou seja, sob elevada pressão parcial de H<sub>2</sub> no meio fermentativo pode ocorrer a solventogênese (fase em que são formados o ácido láctico e solventes). Desse modo, a pressão parcial de H<sub>2</sub> no biorreator inibe sua síntese e as vias metabólicas são direcionadas para a produção de metabólitos mais reduzidos (a coleta periódica e regular dos gases

produzidos, pode apresentar-se como uma maneira de atenuar a pressão parcial de  $H_2$  (ANGENENT *et al.*, 2004; De SÁ *et al.*, 2014).

Por tanto, além do desafio de aprimorar a produção de biohidrogênio, a ciência também se deparou com a necessidade de melhorar o desempenho mecânico de veículos. Estes utilizarão esse gás para resolver o problema da vasta emissão de poluentes e consumo de combustível fóssil, tornando-se processados a baixas temperaturas para o ligamento imediato após a partida, surgindo então as células a combustível (CC) (Figura 21).



**Figura 21** - Funcionamento da célula a combustível (CC). O hidrogênio alimenta o terminal negativo onde serão oxidados no catalisador, produzindo elétrons livres e íons de hidrogênio ( $H^+$ ). Os elétrons vão ao circuito elétrico para serem utilizados na produção da corrente contínua, enquanto que os íons de hidrogênio ( $H^+$ ) vão ao terminal positivo, e junto com o oxigênio que é alimentado pela entrada de ar e o restante do processo, culminam em vapor d'água; o hidrogênio em excesso que não romper ligação, será posteriormente realimentado.

Fonte: MIRANDA *et al.*, 2013.

Como uma bateria alimentada por um tanque de hidrogênio, a CC produz a eletricidade que alimenta o carro e o vapor de água que sai do escapamento. Em contraste com o sistema clássico de combustão, não há partes móveis promovendo o trabalho mecânico para o veículo, apenas um terminal negativo (ânodo) e um positivo (cátodo), além do auxílio de um catalisador de platina (responsável pela quebra da molécula de hidrogênio) e um eletrólito.

O tipo de eletrólito utilizado determina a classificação da CC, e conseqüentemente, sua aplicação, que vai desde a geração de energia por tátil ou estacionária ao setor de transportes. O último, por exemplo, tem-se a membrana trocadora de prótons (PEMFC, Proton Exchange Membrane Fuel Cell), responsável pelo transporte de íons entre o ânodo e o cátodo. No terminal negativo, o catalisador atua na reação de oxidação que liberam os elétrons a serem conduzidos pelo eletrólito até o terminal positivo, a diferença de potencial entre os terminais é enfim utilizada para gerar o trabalho elétrico (Da PORCIÚNCULA, 2013).

O primeiro automóvel movido a CC foi desenvolvido por Kordesch em 1960, e desde então diversas empresas, como Mercedes-Benz, Honda, Toyota e outras, por exemplo, procuraram desenvolver protótipos elétricos



ANA MARIA QUELJEIRO LÓPEZ | ANNA KAROLINE AZEVEDO FARIAS | AMANDA LYS DOS SANTOS SILVA | ELANE CRISTINA LOURENÇO DOS SANTOS e híbridos. Um estudo publicado na Revista de Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade em 2013, buscou analisar o mercado automobilístico diante do uso do gás H<sub>2</sub> como potencial combustível não poluidor. Atualmente, é realidade para a Europa e a América do Norte o investimento em pesquisa e mercado com veículos baseados em CC, substituindo assim os motores a combustão (MIRANDA *et al.*, 2013).

Os veículos movidos a CC são mais eficientes, apresentando um rendimento em torno de 60%, enquanto que a combustão a diesel, por exemplo, possui eficiência energética inferior a 40%. Em 2013, a “Brasil Engenharia” tendo em vista o país como um dos grandes produtores mundiais de ônibus, divulgou a implantação do projeto brasileiro do ônibus movido por CC H<sub>2</sub>, com a finalidade de desenvolver meios de transporte coletivo com emissão zero de poluentes, bem como o acompanhamento da aplicação estacionária e veicular na utilização desse gás com segurança e eficiência (REGINA & LOPES, 2013). Embora vantajoso tal recurso não é ainda bem compreendido por toda população e, como uma tecnologia ainda sob pesquisa, é de elevado custo, especialmente para fabricantes poderem torná-lo um produto competitivo. É necessário então, dar continuidade aos estudos acerca dessa tecnologia, com ênfase na segurança do transporte e armazenamento do H<sub>2</sub>, o qual é altamente inflamável, bem como demonstrar e conscientizar a sociedade da existência de uma estratégia alternativa num setor tão importante.

# 4

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Biotransformação é o processo em que distintas substâncias sofrem diferentes reações químicas dentro de organismos vivos, e estes as convertem em compostos diferentes do original ou as mineralizam completamente a dióxido de carbono e água. Microrganismos são excelentes biotransformadores, e em especial as bactérias, representam alternativa poderosa para remover do ambiente substratos orgânicos poluentes e transformá-los em produtos não só menos agressivos ao ambiente, mas que possam ser recicláveis. Por isso, a comunidade científica tem buscado compreender e aperfeiçoar os processos bioquímicos e de produção em pequena, média e grande escala de bioplásticos e biocombustíveis, os quais, diferentes de seus análogos de função derivados de matérias-primas fósseis, não contribuem para o aumento da concentração de gases do efeito estufa.

São várias as espécies capazes de realizar a biotransformação de resíduos em polímeros plásticos (polihidroxialcanoatos, PHA) e biocombustíveis solventes e hidrogênio molecular ( $H_2$ ), destacando aquelas que vivem no solo e águas residuárias. Dependendo do método de produção, algumas bactérias podem acumular até 90 % de seu peso seco em PHAs. Já na produção de biohidrogênio, a vantagem é a capacidade dos microrganismos utilizarem diferentes substratos e processos bioquímicos para gerá-lo, podendo inclusive trabalhar para tal em cooperação (co-metabolismo), por via fotoautotrófica, fotoheterotrófica, por fermentação na ausência de luz ou por um sistema híbrido desses. Sendo assim, não há necessidade de se purificar os diferentes compostos de resíduos sólidos ou líquidos utilizados no bioprocessos. Vários produtos têm sido aperfeiçoados com incorporação de bioplásticos ou para utilização de biohidrogênio como fonte de energia, como ocorre no setor de transporte, por exemplo.

Assim, a ciência dos bioprocessos tem se dedicado a aperfeiçoar a geração desses produtos em larga escala, seja estudando as condições que afetam diretamente a ação das bactérias ou o melhoramento genético destas. Esse conhecimento visa não só aumentar o rendimento da biotransformação, mas também diminuir os custos de produção e aproveitamento praticamente total dos substratos utilizados, tornando a biotransformação uma alternativa tecnológica sustentável, favorável não só a redução do consumo de matérias-primas fósseis já em esgotamento, e que geram emissões poluentes, mas também removendo resíduos que, em geral são descartados inadequadamente, e se acumulam a ponto de trazer danos ao ambiente e a saúde do homem e demais seres vivos.



# REFERÊNCIAS

ABIEF – Associação Brasileira da Indústria de Embalagens Plásticas Flexíveis. Disponível em: <[http://www.abief.com.br/noticias\\_flex.php](http://www.abief.com.br/noticias_flex.php)> Acesso em: 20 de outubro de 2015.

ABO-HASHESH, M.; HALLENBECK, P.C. **Fermentative hydrogen production**. In: Hallenbeck PC. ed. *Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production*. New York: Springer-Verlag, 2012.

ABRAMOVAY, R.; SPERANZA, J. S.; PETITGAND, C. **Lixo zero – Gestão de resíduos sólidos para uma sociedade mais próspera**. Planeta Sustentável: Instituto Ethos, 2013.

ADESSI, A.; DE PHILIPPIS, R.; HALLENBECK, P.C. **Combined systems for maximum substrate conversion**. In: Hallenbeck PC, ed. *Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production*. New York: Springer Verlag, 2012.

ANGENENT, L.T. *et al.* **Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater**. *Trends Biotechnology*, v.22, n.9, Set., 2004.

ALVIM, J. C. *et al.* **Biorrefinarias: Conceitos, classificação matérias primas e produtos**. *Journal of Bioenergy and Food Science*, v. 1, n. 3, Jan., 2015.

AMARAL, G. CETESB; SINDIPLAST. **Guia Ambiental da Indústria de transformação e reciclagem de materiais plásticos**. São Paulo, 2011.

AMULYA, K. *et al.* **Wastewater as renewable feedstock for bioplastic production: understanding the role of reactor microenvironment and system pH**. *Journal of Cleaner Production*, v. 30, n. 2015, Jan., 2016.

ANDLER, R.; DÍAZ-BARRERA, A. **Ingeniería para producir plásticos desde bacterias**. *Technological and Market aspects of Microbial Bioplastics Production*. *Ingeniería*. v. 27, p. 29-36, 2013.

ANGELINI, S. *et al.* **From biowaste to bioresource: Effect of a lignocellulosic filler on the properties of poly(3-hydroxybutyrate)**. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 71, n. 2014, Jul., 2014.

ARIKAN, E. B.; OZSOY, H. D. **A Review: Investigation of bioplastics**. *Journal of Civil Engineering and Architecture*; v. 9, 2015.

ARUMUGAM, A.; SANDHYA, M.; PONNUSAMI, V. **Biohydrogen and polyhydroxyalkanoate co-production by *Enterobacter aerogenes* and *Rhodobacter sphaeroides* from *Calophyllum inophyllum* oil cake**. *Bioresource Technology*, v.164, n.1, Jul., 2014.

ATLIÉ, A. *et al.* **Continuous production of poly([R]-3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in a multistage bioreactor cascade**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 91, n. 2011, Abr., 2011.

BABEL W.; STEINBÜCHEL A. **Biopolyesters**. *Special issue of advances in Biochem. Eng. Biotechnology*. 1st. ed. Springer- Verlag. Berlin, Alemanha, 2001.

ANA MARIA QUELJEIRO LÓPEZ | ANNA KAROLINE AZEVEDO FARIAS | AMANDA LYS DOS SANTOS SILVA | ELANE CRISTINA LOURENÇO DOS SANTOS BASAK, N. *et al.* **Photofermentative molecular biohydrogen production by purple-non-sulfur (PNS) bacteria in various modes: the present progress and future perspective.** International Journal of Hydrogen Energy, v.39, n.13, Abr., 2014.

BASAK, N.; DAS, D. **The prospect of purple non-sulfur photosynthetic bacteria for hydrogen production: the Present state of the art.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 23, n.1, Jan., 2007.

BIOCYC DATA COLLECTION. **Rhodobacter sphaeroides 2.4.1 Pathway: polyhydroxybutyrate biosynthesis.** Disponível em: <<http://www.biocyc.org/RSPH272943/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY1-3>>. Acesso em 05 de Novembro de 2015.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação – MCTI. Secretaria de Políticas e Programas de Pesquisa e Desenvolvimento – SEPED. Estimativas anuais de emissões de gases de efeito estufa no Brasil. Brasília, 81p, 2013.

BRASKEM. **Polietileno verde – I'm green™.** Disponível em: <<http://www.braskem.com/site.aspx/Onde-e-produzido>> Acesso em: 01 de Dezembro de 2015.

BUGNICOURT, E. *et al.* **Polyhydroxyalkanoate (PHA): review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging.** EXPRESS Polymer Letters, v. 8, n. 11, Jan., 2014.

BYROM, D. **Polymer synthesis by microorganisms: technology and economies.** Trends in Biotechnology, v. 5, n. 9, Set., 1987.

CEYHAN, N.; OZDEMIR, G. **Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) production from domestic wastewater using *Enterobacter aerogenes*.** African Journal of Microbiology Research, v. 5, n. 6, p. 690-702, 2011.

CHAUDHRY, W. *et al.* **Screening for polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacterial strains and comparison of PHA production from various inexpensive carbon sources.** Annals of Microbiology, v. 61, n. 3, Set., 2011.

CHEE, J-Y. *et al.* **Bacterially produced Polyhydroxyalkanoate (PHA): Converting renewable resources into bioplastics.** Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 2010.

CLAASSEN, P.A.M.; DE VRIJE, T. **Non-thermal production of pure hydrogen from biomass: HYVOLUTION.** Intl J Hydrogen Energy; v.31, Set., 2010.

CLAASSEN, P.A.M. *et al.* **Development of a fermentation- based process for biomass conversion to hydrogen gas.** Zuckerindustrie; v.135, 2010.

Da PORCIÚNCULA, C. B. **Simulação e operação de célula de combustível com geração *in situ* de hidrogênio através da corrosão alcalina de alumínio.** 2013.175 f. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Departamento de Engenharia Química. Rio Grande do Sul, 2013.

DAHMAN, Y.; UGWU, C. U. **Production of green biodegradable plastics of poly(3-hydroxybutyrate) from renewable resources of agricultural residues.** Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 37, n. 2014, Ago., 2014.

Das NEVES, L. M. V. **Produção de biohidrogênio por bactérias a partir de resíduos fermentescíveis.** 2009. 108 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. Portugal, 2009.

De SÁ, L. R. V. *et al.* **Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros.** Química Nova, v. 37, n. 5, Abr., 2014.

Dos SANTOS, K. G. *et al.* **Fermentação anaeróbia: uma alternativa para a produção de hidrogênio.** Revista Brasileira de Energias Renováveis, v. 1, n. 2012, 2012.

DUCA, D. *et al.* **Solid biofuels production from agricultural residues and processing by-products by means of torrefaction treatment: the case of sunflower chain.** Journal of Agricultural Engineering, v. 45, n. 416, Jul., 2014.

EPE – EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. Governo Federal. Ministério de Minas e Energia – MME. Nota técnica DEA 13/14. Demanda de Energia 2050. Rio de Janeiro, 2014.

EPE – EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. Governo Federal. Ministério de Minas e Energia – MME. Balanço Energético Nacional 2014 – Relatório síntese, ano base 2013. Rio de Janeiro, 2014.

EPE – EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. Governo Federal. Ministério de Minas e Energia – MME. Resenha Energética Brasileira – Exercício de 2014. Rio de Janeiro, 2015.

ESCAPA, I. F. **Estudio del metabolismo de Polihidroxicanoatos em *Pseudomonas putida*: implicaciones fisiológicas y aplicaciones em el desarrollo de bioplásticos funcionalizados.** 2012. 241 f. Tese de Doutorado. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, 2012.

FÁVARO, L. C. L. **Melhoramento genético de microrganismos para produção de biocombustíveis e químicos renováveis: Integração de abordagens de biologia molecular, biologia sistêmica e engenharia metabólica.** Agroenergia em Revista, n. 5, Dez., 2012.

FIGUEIREDO, T. V. B. *et al.* **Produção e caracterização de Polihidroxicanoatos obtidos por fermentação da glicerina bruta residual do biodiesel.** Química Nova, v. 37, n. 7, Jul., 2014.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. **Polímeros biodegradáveis – Uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos.** Química Nova, v. 29, n. 4, 2006.

GAO, X. *et al.* **Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels.** Current Opinion in Biotechnology, v. 22, n.6, Jun., 2011.

GAZZONI, D. L. **Balanço de emissões de CO<sub>2</sub> por biocombustíveis no Brasil: histórico e perspectivas.** Londrina: EMBRAPA Soja, 2012.

GEBICKI, J. *et al.* **Comparison of Two Reactor Concepts for Anoxygenic H<sub>2</sub> Production by *Rhodobacter capsulatus*.** Journal of Cleaner Production, S36S42, Dez., 2010.

GONZÁLEZ-GARCÍA, Y. *et al.* **Síntese y biodegradación de Polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano.** Revista Internacional de Contaminación Ambiental, v. 29, n. 1, Fev., 2013.

GOMAA, E. **Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* grown on cane molasses fortified with ethanol.** Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 57, n.1, Jan./Fev., 2014.

HAFUKA, A. *et al.* **Effect of feeding regimens on polyhydroxybutyrate production from food wastes by *Cupriavidus necator***. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 3, Fev., 2011.

HALLENBECK, P.C. **Fermentative hydrogen production: principles progress and prognosis**. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 34, n. 17, Set., 2009.

HALLENBECK, P.C. **Microbial paths to renewable hydrogen production**. *Biofuels*; v. 2, Abr., 2011.

HALLENBECK, P.C.; ABO-HASHESH, M.; GHOSH, D. **Strategies for improving biological hydrogen production**. *Bioresource Technology*, v. 110, Abr., 2012.

HALLENBECK, P.C. **Fundamentals of dark hydrogen fermentations multiple pathways and enzymes**. In: Azbar N, Levin DB. Eds. *State of the Art and Progress in Production of Biohydrogen*. Bentham Science Publishers. Cap. 6, p. 94–111, 2012.

HAYWOOD, G. W. *et al.* **The role of NAD- and NADPH linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus***. *FEMS Microbiology Letters*, v. 52, Abr., 1988.

HOLMES, P.A. **Applications of PHB - a microbially produced biodegradable thermoplastic**. *Physical Technology*, v. 16, 1985.

HUFFER, S. *et al.* ***Escherichia coli* for biofuel production: bridging the gap from promise to practice**. *Trends in Biotechnology*, v. 30, n. 10, Ago., 2012.

HUISMAN, G. W. O. *et al.* **Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads**. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 55, Ago., 1989.

IEA – International Energy Agency. *World Energy Outlook 2013*. France, 12p, 2013.

IEA – International Energy Agency. *World Energy Outlook 2014*. France, 12p, 2014.

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

JENDROSSEK, D. **Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes)**. *Journal of Bacteriology*, v. 191, n.10, Mar., 2009.

JENDROSSEK, D.; PFEIFFER, D. **New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate)**. *Environmental Microbiology*, v.16, n. 8, Jan., 2014.

JIANG, Y. *et al.* **Waste to resource: converting paper mill wastewater to bioplastic**. *Water Research*, v. 46, n. 2012, Nov., 2012.

KERN, M. *et al.* **Evidence for a regulatory link of nitrogen fixation and photosynthesis in *Rhodobacter capsulatus* via HvrA**. *Journal of Bacteriology*, v.180, n. 7, Jan., 1998.

KESKIN, T.; HALLENBECK, P.C. **Enhancement of biohydrogen production by two-stage systems: dark and photofermentation.** In: Baskar C, Baskar S, Dhillon RS. Eds. Biomass Conversion. New York: Springer-Verlag,. Cap. 10, Mai., 2012.

KESSLER, B.; WITHOLT, B. **Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism.** Journal of Biotechnology, v. 86, 2001.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A.K. **Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates.** Process Biochemistry, v. 40, n. 2, Fev., 2005.

KOIZUMI, T. **Biofuels and food security.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 52, Dez., 2015.

KULPREECHA, S. *et al.* **Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*.** Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 107, n. 3, Mar., 2009.

LAGEVEEN, R. G. *et al.* **Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly(R)-3-hydroxyalkanoates and poly(R)-3hydroxyalkenoates.** Applied and Environmental Microbiology, v. 54, Dez., 1988.

LEE, S. Y.; LEE, Y. K.; CHANG, H. N. **Stimulatory effects of amino acids and oleic acid on poly(3-hydroxybutyric acid) synthesis by recombinant *Escherichia coli*.** Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 79, Nov., 1995.

LEMOIGNE, M. **Produits de dehydration et de polymerisation de l'acide  $\beta$ -oxobutyrique.** Bulletin de la Société de Chimie Biologique, v. 8, 1926.

LÓPEZ, V. M. **Catabolismo de los Polihidroxicanoatos em la bacteria depredadora *Bdellovibrio bacteriovorus*: aplicaciones biotecnológicas y diseño de nuevos sistemas para la extracción de bioplástico en cultivos bacterianos.** 2013. 155 f. Tese de Doutorado. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, 2013.

LUDDEN, P.W.; ROBERTS, G.P. **The biochemistry and genetics of nitrogen fixation by photosynthetic bacteria.** In: BLANKENSHIP, R.E.; MADIGAN, M.T.; BAUER, C.E. eds. Anoxygenic photosynthetic bacteria. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; p. 929–947, 1995.

MACHADO, I. M. P.; ATSUMI, S. **Cyanobacterial biofuel production.** Journal of Biotechnology, v. 162, n. 1, Nov., 2012.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. **Metabolic Engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 63, n. 1, Mar., 1999.

MANO, E.B.; MENDES, L.C. **A natureza e os polímeros: meio ambiente, geopolímeros, fitopolímeros e zoopolímeros.** 1ª ed. São Paulo: Blücher, 2013.

MARJADI, D.; DHARAIYA, N. **Recovery and characterization of poly(3-Hydroxybutyric acid) synthesized in *Staphylococcus epidermidis*.** African Journal of Environmental Science and Technology, v. 8, n. 6, Jun., 2014.



ANA MARIA QUELJEIRO LÓPEZ | ANNA KAROLINE AZEVEDO FARIAS | AMANDA LYS DOS SANTOS SILVA | ELANE CRISTINA LOURENÇO DOS SANTOS MIRANDA, L. H. T. G.; SEO, E. S. M.; JUNIOR, A. V. **Células a combustível como alternativa para redução de CO equivalente na frota de veículos leves**. Revista de Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade, v. 8, n. 2, 2013.

MOTA, C. J. A.; MONTEIRO, R. S. **Química e Sustentabilidade: Novas fronteiras em biocombustíveis**. Química Nova, v. 36, n. 10, 2013.

NAHEED, N. et al. **Biosynthesis of polyhydroxybutyrate in *Enterobacter* sp. SEL2 and *Enterobacteriaceae bacterium* sp. PFW1 using sugar cane molasses as media**. African Journal of Biotechnology, 11, n.16, Fev., 2012.

NARANJO, J. M.; CARDONA, C. A.; HIGUITA, J. C. **Use of residual banana for polyhydroxybutyrate (PHB) production: Case of study in an integrated biorefinery**. Waste Management, v. 34, n. 12, Dez., 2014.

NARAYANAN, A.; RAMANA, K. V. **Polyhydroxybutyrate production in *Bacillus mycooides* DFC1 using response surface optimization for physico-chemical process parameters**. Biotech, v. 2, n. 4, Mar., 2012.

NETTO, E. F. da S.; LEAL, F. P. da S. **Biocombustíveis: uma vantagem para o futuro**. Revista de Divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense; v. 2, n. 1, 2012.

NEVES, L. M. V. das. **Produção de biohidrogênio por bactérias a par tir de resíduos fermentescíveis**. 2009. 108 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, 2009.

NOVA-INSTITUTE. **European Bioplastics, Institute for Bioplastics and Biocomposites**. 2014. Disponível em: <http://en.european-bioplastics.org/market/applications/>. Acesso em 14 de novembro de 2015.

NUNES, E.C.D.; LOPES, F.R.S. **Polímeros: conceitos, estrutura molecular, classificação e propriedades**. 1ª ed. São Paulo: Érica, 2014.

((O)) ECO. **Estudo mapeia o lixo jogado nos oceanos**. Disponível em: <http://www.oeco.org.br/noticias/estudo-mapeia-o-lixo-jogado-nos-oceanos/>. Acesso em 08 de Dezembro de 2015.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. **Hidrólise enzimática de biomassa**. Química Nova, v. 33, n. 7, Jul., 2010.

ÖZGÜR, E. et al. **Biohydrogen production by *Rhodobacter capsulatus* on acetate at fluctuating temperatures**. Resource, Conservation and Recycling, v. 54, n. 5, Mar., 2010.

ÖZKAN, E. et al. **Photofermentative hydrogen production using dark fermentation effluent of sugar beet thick juice in outdoor conditions**. International Journal of Hydrogen Energy; v. 32, n. 2, Jan., 2012.

PALMERI, R. et al. **Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production through conversion of glycerol by selected strains of *Pseudomonas mediterranea* and *Pseudomonas corrugata***. Chemical Engineering Transactions, v. 27, 2012.

PAOLI, G.C.; VICHIVANIVES, P.; TABITA, F.R. **Physiological control and regulation of the *Rhodobacter capsulatus* cbb operons**. Journal of Bacteriology, v. 180, n. 16, Ago., 1998.

PETROBRAS. Ministério de Minas e Energia – MME. **Biocombustíveis: 50 perguntas e respostas sobre este novo mercado**. 44p, 2007.

- PHILP, J. C. *et al.* **Bioplastic Science from a policy vantage point.** *New Biotechnology*, v. 30, n. 6, Dez., 2013.
- PRADELLA, J. G. C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos.** Centro de Gestão de Estudos Estratégicos (CGEE), Laboratório de Biotecnologia Industrial – LBI/CTPP. São Paulo. Relatório técnico, n.84, p.205-396, 2006.
- QUILLAGUAMÁN, J. **Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 85, n. 6, Dez., 2010.
- RAO, M. G.; BHARATHI, P.; AKILA, R. M. **A Comprehensive review on biopolymers.** *ScientificReviews & Chemical Communications*. v. 4, n. 2, Abr., 2014.
- REGINA, I. C.; LOPES, M. C. **Ônibus: a célula a combustível hidrogênio para transporte urbano no Brasil.** *Brasil Engenharia*, v. 616, 2013.
- REHM, B.H.A. **Polyestersynthases: natural catalysts for plastics.** *Biochemical Journal*, v. 376, n.1, 2003.
- REIS, K. C. *et al.* **Particles of coffee wastes as reinforcement in Polyhydroxybutirate (PHB) based composites.** *Materials Research*, v. 18, n. 3, Jun., 2015.
- RIEDEL, S.L. *et al.* **Lipid and fatty acid metabolism in *Ralstonia eutropha*: relevance for the biotechnological production of value-added products.** *Applied and Microbiology Biotechnology*, v. 98, n. 4, Dez., 2014.
- SANTOS, A. S. F.; FREIRE, F. H. de O.; da COSTA, B. L. N. **Sacolas plásticas: Destinações sustentáveis e alternativas de substituição.** *Polímeros*, v. 22, n. 3, 2012.
- SATOH, Y. *et al.* **Isolation of a thermotolerant bacterium producing medium-chain-length polyhydroxyalkanoate.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 111, n.4, Jul., 2011.
- SHAMALA, T. *et al.* **Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing *Bacillus* spp. using the polymerase chain reaction (PCR).** *Journal of Applied Microbiology*, v. 94, n. 3, 2003.
- SHAH, A. A. *et al.* **Biological degradation of plastics: A comprehensive review.** *Biotechnology Advances*, v. 26, n. 3, Jun., 2008.
- SHENOY, S.; MASCARENHAS, J.; ARUNA, K. **Optimization of polyhydroxalkanoate accumulation by *Klebsiella* sp. NCCP-138 isolated from oil contaminated soil.** *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, v. 3, n.4, Out., 2012.
- SHI, H.; SHIRAIISHI, M.; SHIMIZU, K. **Metabolic flux analysis for biosynthesis of poly( $\beta$ hydroxybutyric acid) in *Alcaligenes eutrophus* from various carbon sources.** *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 84, n. 6, Set., 1997.
- SHOW, K.Y.; LEE, D.J.; CHANG, J.S. **Bioreactor and process design for biohydrogen production.** *Bioresource Technology*, v. 102, n. 18, Set., 2011.
- SINHA, P.; PANDEY, A. **An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production.** *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, n. 13, Jul., 2011.

SOLAIMAN, D.K.Y.; ASHBY, R.D. **Rapid genetic characterization of poly(hydroxyalkanoate) synthase and its applications**. *Biomacromolecules*, v.6, n. 1, Mar., 2005.

SOROUDI, A.; JAKUBOWICZ, I. **Recycling of bioplastics, their blends and biocomposites: A review**. *European Polymer Journal*, v. 49, n. 10, Out., 2013.

SUDESH, K.; FUKUI, T.; DOI, Y. **Genetic Analysis of Comamonas acidovorans Polyhydroxyalkanoate Synthase and Factors Affecting the Incorporation of 4- Hydroxybutyrate Monomer**. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, Set., 1998.

SUKAN, A.; ROY, I.; KESHAVARZ, T. **Dual production of biopolymers from bacteria**. *Carbohydrate Polymers*, v. 126, Ago., 2015.

TOKIWA, Y. *et al.* **Biodegradability of plastics**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 10, n. 9, Ago., 2009.

TORTORA, G. J.; BERDELL, R. F.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10<sup>o</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRIBELLI, P.M. *et al.* **Genome sequence of the polyhydroxybutyrate producer Pseudomonas, a highly stress-resistant antarctic bacterium**. *Journal of Bacteriology*, v. 194, n. 9, Mai., 2012.

TRIPATHI, A. D.; SRIVASTAVA, S. K.; SINGH, R. P. **Statistical optimization of physical process variables for bioplastic (PHB) production by Alcaligenes sp.** *Biomass & Bioenergy*, v. 55, Ago., 2013.

TRCHOUNIAN, A. **Mechanisms for hydrogen production by different bacteria during mixed-acid and photo-fermentation and perspectives of hydrogen production biotechnology**. *Critical Reviews in Biotechnology*. v. 35, n. 1, Jul., 2015.

TRCHOUNIAN, K.; TRCHOUNIAN, A. **Hydrogen production from glycerol by Escherichia coli and other bacteria: an overview and perspectives**. *Applied Energy*, v. 156, Out., 2015.

VALERO-VALDIVIESO, M. F.; ORTEGÓN, Y.; USCATEGUI, Y. **Biopolímeros: Avanzos y perspectivas**. *Dyna*, v. 80, n. 181, Jun., 2013.

VAN-THUOC, D. *et al.* **Polyester production by halophilic and halotolerant bacterial strains obtained from mangrove soil samples located in northern Vietnam**. *Microbiology Open*, v.1, n. 4, Out., 2012.

WANG, Y.; YIN, J.; CHEN, G. **Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities**. *Current Opinion in Biotechnology*, v.30, n. 1, Jun., 2014.

WASHAM, C. **Plastics go green**. *Chemical Matters Review*, 2010.

WEBB, H. K. *et al.* **Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly(ethylene terephthalate)**. *Polymers*, v.5, n.1, Dez., 2013.

WORLD BANK (2012). **What a waste. A global review of solid waste management.** Disponível em: <<http://web.worldbank.org/WBSITE/EXTERNAL/TOPICS/EXTSDNET/0,contentMDK:23212147~menuPK:64885113~pagePK:7278667~piPK:64911824~theSitePK:5929282,00.html>>. Acesso em 10 de agosto de 2015.

YAMANE, T. **Yield of poly-D-(-)-3-hydroxybutirate from various carbon sources: a theoretical study.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 41, Jan., 1993.

YATES, M. R.; BARLOW, C. Y. **Life cycle assessments of biodegradable commercial biopolymers – A critical review.** *Resources, Conservation and Recycling*, v. 78, n. 54, Set., 2013.

ZHANG, H. *et al.* **Production of Polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, n. 4, Abr., 1994.