

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**ADRIELI NAIARA FAVARIN**

**CARATERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE VINHAÇA DE ETANOL DE MILHO E  
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DO SEU POTENCIAL USO COMO SUBSTRATO NA  
PRODUÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) POR *Bacillus megaterium***

**TOLEDO**

**2022**

**ADRIELI NAIARA FAVARIN**

**CARATERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE VINHAÇA DE ETANOL DE MILHO E  
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DO SEU POTENCIAL USO COMO SUBSTRATO NA  
PRODUÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) POR *Bacillus megaterium***

**Physico-chemical characterization of corn ethanol vinage and bibliographic  
review of its potential use as a substrate in the production of poly(3-  
hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium***

Trabalho de conclusão de curso de graduação  
apresentada como requisito para obtenção do título  
de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e  
Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal  
do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Prof. Dr. Luís Felipe Minozzo  
Figueiredo.

Coorientador(a): Prof. Dr. Renato Eising.

**TOLEDO**

**2022**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

**ADRIELI NAIARA FAVARIN**

**CARATERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE VINHAÇA DE ETANOL DE MILHO E  
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DO SEU POTENCIAL USO COMO SUBSTRATO NA  
PRODUÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) POR *Bacillus megaterium***

Trabalho de Conclusão do Curso Superior  
Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia  
apresentado como requisito para obtenção do título  
de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e  
Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal  
do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 07/Fevereiro/2022

---

Luís Felipe Minozzo Figueiredo (orientador)  
Doutorado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Fabiano Bisinella Scheufele (membro avaliador)  
Doutorado  
Universidade Tecnológica Federal

---

Cleverson Busso (membro avaliador))  
Doutorado  
Universidade Tecnológica Federal

**TOLEDO**

**2022**

Dedico este trabalho à minha família e amigos  
por serem minha base e meu maior apoio.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná por oferecer uma educação pública, gratuita e de qualidade. A sua existência transforma vidas.

À Safras Indústria e Comércio de Biocombustíveis, de Sorriso (Mato Grosso) pelo fornecimento da vinhaça utilizada em pesquisa. Obrigada pela contribuição com a pesquisa pública.

A todos os professores que fizeram parte da minha trajetória acadêmica, em especial meu professor orientador Prof. Dr. Luís Felipe Minozzo Figueiredo e ao professor coorientador Prof. Dr. Renato Eising pelo apoio na realização deste trabalho. Obrigada por dividirem vossos conhecimentos com maestria e ternura.

À Telma Beiser De Melo Zara, por me ajudar a enxergar como a vida é linda, mesmo diante dos percalços. Continue sendo luz na vida das pessoas.

Aos meus amigos que foram os pilares dessa graduação, me ajudando nos momentos mais difíceis e, também, compartilhando os momentos mais felizes. Agradeço por essa amizade que me fez continuar.

À minha família, que sempre me amou e apoiou incondicionalmente, principalmente aos meus pais Rosanilta Kinzler Favarin e Ademar Favarin, e, minha irmã, Beatriz Amanda Favarin, que são as pessoas mais importantes da minha vida. Amo vocês com todas as minhas forças.

·  
·

*“Cada pessoa deve trabalhar para o seu  
aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo,  
participar da responsabilidade coletiva por  
toda a humanidade.”*

*Marie Curie*

## RESUMO

O poli-3-hidroxibutirato é um biopolímero da classe dos polihidroxialcanoatos sintetizados por microrganismos. Possuem diversas aplicações biomédicas, farmacêuticas e em substituição aos plásticos petroquímicos em função das características de biocompatibilidade e biodegradabilidade. Sua síntese por *Bacillus megaterium* demanda de fonte de carbono advinda de matéria-prima natural, o que torna o processo custoso. Por outro lado, o Brasil possui grande produção residual de vinhaça obtida do processo de fermentação alcoólica do etanol de milho. Neste trabalho, realizou-se a caracterização físico-química de uma vinhaça fornecida pela usina de etanol de milho Safras de Mato Grosso. Através de revisão bibliográfica da obtenção de poli 3 hidroxibutirato sintetizado por *B. megaterium*, buscou-se analisar teoricamente a viabilidade do uso deste resíduo como principal fonte de carbono e concluiu-se que este se adequa ao processo pelo fato de ser uma fonte rica em carbono, que é o nutriente limitante do processo. Devido às suas características e a sua abundante disponibilidade no Brasil, a vinhaça torna-se um potencial substrato para produção de biopolímeros microbianos, reduzindo os custos dessa produção. Esse processo se torna ambientalmente vantajoso pois além de destinar a vinhaça, ainda minimiza os custos de produção do P(3HB).

Palavras-chave: Biopolímero; Resíduo; Polihidroxialcanoatos; *B. megaterium*.

## ABSTRACT

Poly-3-hydroxybutyrate is a biopolymer from the class of polyhydroxyalkanoates synthesized by microorganisms. They have several biomedical and pharmaceutical applications and as a replacement for petrochemical plastics due to their biocompatibility and biodegradability characteristics. Its synthesis by *Bacillus megaterium* demands a carbon source from natural raw materials, which makes the process expensive. On the other hand, Brazil has a large residual production of vinasse obtained from the process of alcoholic fermentation of corn ethanol. In this work, the physicochemical characterization of a vinasse supplied by the corn ethanol plant Safras in Mato Grosso was carried out. Through a literature review of obtaining poly 3 hydroxybutyrate synthesized by *B. megaterium*, we sought to theoretically analyze the feasibility of using this residue as the main source of carbon and it was concluded that it is suitable for the process because it is a source rich in carbon. carbon, which is the limiting nutrient in the process. Due to its characteristics and its abundant availability in Brazil, vinasse becomes a potential substrate for the production of microbial biopolymers, reducing the costs of this production. This process becomes environmentally advantageous because, in addition to disposing of vinasse, it also minimizes the production costs of P(3HB).

Keywords: Biopolymer; Residue; Polyhydroxyalkanoates; *B. megaterium*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Produção de etanol de milho por regiões com destaque para alguns estados.....	25
Figura 1 - Fluxograma de produção de etanol anidro de milho por via seca e geração de coprodutos.....	26
Figura 2 - Formação do polímero polietileno através de moléculas de etileno.....	30
Figura 3 - Estrutura geral de PHA's e seus respectivos representantes.....	35
Figura 4 - Fórmula estrutural do ácido 3-butírico e do polímero PHB.....	36
Figura 5 - Morfologia da micrografia eletrônica de varredura de <i>Bacillus megaterium</i> .....	39
Figura 6 - Fluxograma de obtenção do PHB.....	41
Figura 7 - Grânulos de polímero do P(3HB) no interior do <i>B. megaterium</i> .....	42
Figura 8 - Estrutura do grânulo de P(3HB) em <i>B. megaterium</i> .....	42
Figura 9 - Via metabólica do microrganismo para a obtenção do P(3HB). ....	44
Figura 10 - Rotas metabólicas conhecidas para suprimento do monômero (R)-3-hidroxi-butirato utilizado na síntese de P(3HB).....	45
Figura 11 - Metabolismo cíclico da biossíntese e degradação do P(3HB) em bactérias.....	46

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1 - Termos utilizados nas pesquisas VS bases de dados e a quantidade de documentos encontrados .....</b>	<b>19</b>
<b>Tabela 2 - Composição da vinhaça gerada a partir do etanol de milho .....</b>	<b>29</b>
<b>Tabela 3 - Densidade da vinhaça de etanol milho .....</b>	<b>47</b>
<b>Tabela 4 - pH da vinhaça de etanol de milho .....</b>	<b>47</b>
<b>Tabela 5 - Condutividade medida da vinhaça de etanol de milho.....</b>	<b>48</b>
<b>Tabela 6 - Grau Brix da vinhaça de etanol de milho.....</b>	<b>48</b>
<b>Tabela 7 - Valores de sólidos totais, fixos e voláteis da vinhaça de etanol de milho.....</b>	<b>48</b>
<b>Tabela 8 - Caracterização físico-química da vinhaça de etanol de milho .....</b>	<b>49</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

CONAB	Companhia Nacional do Abastecimento
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária
OPEP	Organização dos Países Exportadores de Petróleo
P(3HB)	Polihidroxibutirato
pH	Potencial Hidrogeniônico
PHA	Polihidroxialcanoatos
SciELO	Scientific Electronic Library Online
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
UNEM	União Nacional do Etanol de Milho

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Levantamento bibliográfico.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2</b>	<b>Procedimentos experimentais.....</b>	<b>16</b>
3.2.1	<i>Massa específica.....</i>	<i>16</i>
3.2.2	<i>Potencial hidrogeniônico .....</i>	<i>17</i>
3.2.3	<i>Condutividade elétrica .....</i>	<i>17</i>
3.2.4	<i>Grau BRIX.....</i>	<i>17</i>
3.2.5	<i>Sólidos totais, fixos e voláteis.....</i>	<i>17</i>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>169</b>
<b>4.1</b>	<b>Resultados do levantamento.....</b>	<b>19</b>
<b>4.2</b>	<b>Revisão bibliográfica .....</b>	<b>20</b>
4.2.1	<i>Panorama mundial da produção de milho .....</i>	<i>20</i>
4.2.2	<i>Histórico do etanol de cana-de-açúcar no brasil e início da sua produção a partir do milho.....</i>	<i>21</i>
4.2.3	<i>Dados da produção de etanol de milho.....</i>	<i>23</i>
4.2.4	<i>Processo de produção de etanol de milho .....</i>	<i>25</i>
4.2.5	<i>Vinhaça .....</i>	<i>27</i>
4.2.6	<i>Biopolímeros .....</i>	<i>29</i>
<u>4.2.6.1</u>	<u><i>Biopolímeros obtidos por processos fermentativos .....</i></u>	<u><i>32</i></u>
<u>4.2.6.2</u>	<u><i>Polihidroxialcanoatos.....</i></u>	<u><i>33</i></u>
<u>4.2.6.3</u>	<u><i>Poli(3-hidroxibutirato) .....</i></u>	<u><i>36</i></u>
4.2.7	<i>Bacillus megaterium .....</i>	<i>39</i>
4.2.8	<i>Síntese de P(3HB) por B. megaterium .....</i>	<i>40</i>
<b>4.3</b>	<b>Procedimentos experimentais.....</b>	<b>46</b>
4.3.1	<i>Massa específica.....</i>	<i>47</i>
4.3.2	<i>Potencial hidrogeniônico .....</i>	<i>47</i>
4.3.3	<i>Condutividade elétrica .....</i>	<i>47</i>
4.3.4	<i>Grau Brix .....</i>	<i>48</i>
4.3.5	<i>Sólidos totais, fixos e voláteis.....</i>	<i>48</i>
4.3.6	<i>Caracterização físico-química da vinhaça de etanol de milho.....</i>	<i>48</i>

<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>523</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil encontra-se como terceiro maior produtor de milho do mundo (CONAB, 2020a) e nos últimos anos vem agregando valor ao produto através da expansão e consolidação da produção de etanol do cereal. Essa produção possui grande relevância econômica, entretanto é um processo que acaba gerando vinhaça como resíduo, se tornando um problema ambiental.

Outrora, a única destinação que se tinha para a vinhaça era seu despejo sobre os solos como forma de fertirrigação, entretanto devido às suas características físico-químicas acabam desencadeando problemas a como salinização do solo, a contaminação dos recursos hídricos por excesso de nutrientes, a contaminação por metais e contaminação de águas subterrâneas. Para tanto, buscam-se novas formas de destinar este resíduo, principalmente desenvolvendo seu uso como substrato para crescimento microbiano em processos fermentativos.

Um desses processos é o cultivo de microrganismos para a produção de biopolímeros, pois além de sanar a problemática da fertirrigação, também desenvolve produtos de grande aplicabilidade e valor econômico. Dentre as inúmeras vantagens destes biopolímeros, está a possibilidade da substituição de materiais derivados da indústria petroquímica, visto que é uma fonte de origem não-renovável e que, ao mesmo tempo, ao serem descartados geram resíduos que perduram anos na natureza.

Dentre as classes de biopolímeros produzidas por microrganismos está o poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)) que devido a suas características biocompatíveis e sua biodegradabilidade, possui grande demanda na área biomédica, potencial como agente de medicamentos e utilização na indústria de alimentos para produção de embalagens. Um dos microrganismos que sintetizam o P(3HB) é o *Bacillus megaterium*, que acumula o biopolímero como fonte de reserva energética.

Apesar de já serem produzidos por microrganismos usando fontes residuais, os biopolímeros ainda possuem elevado custo de produção em detrimento dos polímeros oriundos de fontes não-renováveis. Para tanto, deve-se realizar maiores investimentos em pesquisa para que de fato essa produção seja economicamente viável. Aliando o uso dessas matérias-primas mais baratas ao estudo de parâmetros do processo fermentativo, pode-se chegar a exploração máxima do potencial dos microrganismos produtores, contribuindo para o aumento da produção do polímero e,

consequentemente, para a redução de custos. Para tanto a vinhaça de etanol de milho surge como uma boa alternativa.

O uso de polímeros advindos de fontes naturais é viável a nível social e ambiental, pois contribui protegendo o meio ambiente para as futuras gerações tendo como base um desenvolvimento sustentável. Nosso país tem posição mundial privilegiada por dispor de matérias-primas renováveis a baixo custo e por, potencialmente, possuir mão-de-obra qualificada formada pelos diversos grupos de pesquisa já estabelecidos.

Isso possibilita nos tornarmos plataforma mundial produtora e exportadora de biopolímeros, desde que ações concretas de financiamento e de organização das atividades de pesquisa e desenvolvimento sejam estabelecidas pelos órgãos públicos, em consonância com os setores produtivos do país. Assim, criam-se condições oportunas para utilizar o *Bacillus megaterium* para a produção de P(3HB) utilizando a vinhaça proveniente da produção do etanol de milho.

## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliar, teoricamente, a produção de biopolímeros a partir do cultivo de *Bacillus megaterium* utilizando a vinhaça proveniente da produção do etanol de milho como fonte alternativa de carbono.

### 2.1 Objetivos específicos

- Caracterizar físico-quimicamente a vinhaça de etanol de milho;
- Revisar a bibliografia específica acerca do assunto, buscando por artigos relacionados ao tema, aplicando uma seleção dos resultados pautados em data mais recente;
- Analisar os dados obtidos pela pesquisa;
- Compreender a teoria envolvida com a formação bioquímica do P(3HB) pelo *B. megaterium*;
- Relacionar a importância ambiental acerca do processo de reutilização de vinhaça para a produção de um biopolímero.

### 3 METODOLOGIA

O trabalho em questão apresenta uma metodologia híbrida, sendo elaborado através de procedimentos experimentais em laboratório e também pesquisa teórica para elaboração de levantamento bibliográfico.

#### 3.1 Levantamento bibliográfico

Parte deste trabalho foi elaborado a partir de uma revisão da literatura disponível nas bases de dados SciELO, Google Acadêmico, Scopus, PubMed Elsevier e CAPES. Também, utilizaram-se dados obtidos de revistas e, sites e banco de dados de órgão oficiais. A pesquisa englobou os resultados de artigos com a data de publicação, principalmente, entre os anos de 2015 e 2021. Utilizou-se os termos de pesquisa: *Bacillus megaterium*; vinhaça de milho; biopolímeros; polihidroxicanoatos; P(3HB); poli-3-hidroxibutirato e etanol de milho, *corn stillage*, *biopolymers*; *polyhydroxyalkanoates*; *poly-3-hydroxybutyrate and corn ethanol*,

Utilizaram-se, eventualmente, outros termos específicos que não constam no levantamento, devido à baixa frequência de uso.

#### 3.2 Procedimentos experimentais

A amostra de vinhaça utilizada para as análises foi gentilmente fornecida pela usina de etanol de milho Safras de Mato Grosso, de um lote não identificado produzido em setembro de 2019. A amostra foi acondicionada em embalagem plástica e congelada em *freezer* comum para conservação de suas características. Foi transportada até o município de Toledo em recipiente com temperatura conservada.

Já no laboratório da UTFPR, a amostra foi fracionada e acondicionada em embalagens plásticas de menor volume que foram armazenadas no *freezer* comum. Para a realização de cada um dos procedimentos experimentais, descongelou-se uma fração da amostra em banho-maria com temperatura entre 70 e 80 °C.

##### 3.2.1 Massa específica

A massa específica da vinhaça foi determinada por picnometria segundo a metodologia de Queiroz *et al.* (2017).

Utilizou-se a balança analítica Shimadzu AY224 para medir a massa de três béqueres previamente secos em estufa. Após, foram colocados 10 mL de amostra em cada um dos béqueres, que foram pesados novamente.

A massa específica ( $\rho$ ) foi determinada pela Equação 1.

$$\rho = \frac{m}{V_{\text{amostra}}} \quad (1)$$

Sendo  $m$  a massa da amostra de vinhaça já reduzida a massa do béquer vazio (em gramas), e  $V_{\text{amostra}}$  representa o volume de amostra utilizada no ensaio (em mL).

### 3.2.2 Potencial hidrogeniônico

Para a leitura do potencial hidrogeniônico (pH), três amostras de cerca de 150 mL foram colocadas em béqueres e realizaram-se as leituras utilizando um medidor de pH segundo a metodologia da CETESB (1978).

### 3.2.3 Condutividade elétrica

Realizou-se a medida da condutividade elétrica da vinhaça utilizando um condutivímetro digital de bancada previamente calibrado utilizando a metodologia proposta por Queiroz *et al.* (2017).

### 3.2.4 Grau BRIX

Mediu-se o grau brix da vinhaça com auxílio de um refratômetro analógico utilizando a metodologia elaborada por Queiroz *et al.* (2017).

### 3.2.5 Sólidos totais, fixos e voláteis

Lavaram-se três cadinhos de fusão esmaltados com capacidade volumétrica de 130 mL utilizando água destilada. Posteriormente, estes foram secas e calcinados em um forno-mufla por uma hora e transferidos para dessecador para atingir a temperatura ambiente. Pesou-se, então, cada um dos cadinhos de fusão em balança analítica e o valor foi anotado (P1). Após, transferiu-se 10 mL de vinhaça

homogeneizada em um béquer para cada um dos cadinhos de fusão, secou-se em banho-maria até a redução do teor hídrico e colocou-se na estufa a uma temperatura de 105 °C, onde, através de balança analítica, fez-se pesagens periódicas a fim de constatar a obtenção de massa constante que se deu após um período de 50 horas. Pesou-se os cadinhos de fusão (P2) para a obtenção do peso dos sólidos totais.

Após a execução da etapa anterior, os cadinhos de fusão com o resíduo da secagem foram colocados em um forno-mufla a 550 °C por 60 minutos. Então, foram levados ao dessecador até atingir a temperatura ambiente e posteriormente foram pesados em balança analítica (P3).

Dessa forma, com o auxílio das Equações 2, 3 e 4, obteve-se os teores de sólidos totais, fixos e voláteis. Os resultados são expressos em mg/L (SABESP, 1999).

$$ST = \frac{P2 - P1}{V_{amostra}} \quad (2)$$

$$SF = \frac{P3 - P1}{V_{amostra}} \quad (3)$$

$$SV = ST - SF \quad (4)$$

Nas quais: SF: sólidos fixos; ST: sólidos totais; SV: sólidos voláteis; P1: tara do cadinho de fusão (g); P2: cadinho de fusão com vinhaça após secagem (g); P3: cadinho de fusão com vinhaça após calcinação (g) e  $V_{amostra}$ : volume de vinhaça (mL).

## 4 RESULTADOS

Os resultados dividiram-se entre os resultados dos procedimentos experimentais e os resultados obtidos nas buscas por artigos em bases de dados.

### 4.1 Resultados do levantamento

Para se obter os resultados de produções acadêmicas, fez-se a busca em algumas das principais bases de dados, as quais foram descritas na metodologia. Elaborou-se a Tabela 1, que apresenta o valor numérico de resultados totais que foram apresentados ao utilizar na ferramenta de busca os termos: *Bacillus megaterium*; vinhaça de milho; biopolímeros; polihidroxialcanoatos poli-3-hidroxibutirato e sua abreviação P(3HB); etanol de milho; *stillage*; *vinasse*; *biopolymers*; *polyhydroxyalkanoates*; *corn ethanol* e *poly-3-hydroxybutyrate*.

Para este levantamento numérico, não se utilizou nenhum critério de exclusão de resultados não pertinentes ao uso.

**Tabela 1 - Termos utilizados nas pesquisas VS bases de dados e a quantidade de documentos encontrados**

Termos de busca	SciELO	Google acadêmico	Elsevier	CAPES	PubMed	Science direct
<i>Bacillus megaterium</i>	49	83.100	200	11.967	4.090	11.006
Vinhaça	134	9.420	0	679	77	12
Biopolímeros	115	23.100	0	995	65	168
Polihidroxialcanoatos	14	2.980	0	101	1	8
P(3HB)	0	29.700	5.291	2.823	583	2.287
Poli-3-Hidroxibutirato	1	1.850	25.969	16	1	7
Etanol de milho	19	35.600	3.960	447	5	5
<i>Stillage</i>	26	17.900	1	1.899	259	2.640
<i>Vinasse</i>	201	22.000	7	2.601	413	2.782
<i>Biopolymers</i>	177	630.000	322	173.068	550.961	115.953
<i>Polyhydroxyalkanoates</i>	40	31.300	36	11.073	3.357	8.007
<i>Corn ethanol</i>	45	1.280.000	768	59.763	2.190	97.490
<i>Poly-3-hydroxybutyrate</i>	5	41.100	26.076	243	3.237	12.144

Valores encontrados até a data: 09/02/2022.

Fonte: Autor (2022).

Entre os resultados obtidos, algumas publicações foram usadas como referência a este levantamento bibliográfico. Utilizaram-se como critério de seleção as

datas mais recentes, dando preferência às publicações feitas a partir do ano de 2015; também, priorizou-se os trabalhos em que o título relacionava dois os mais termos da pesquisa.

Para a obtenção de levantamentos da produção de milho e etanol de milho, utilizaram-se as bases de dados da CONAB e IBGE com datas posteriores à 2015.

## **4.2 Revisão bibliográfica**

Após a pesquisa de trabalhos científicos nas bases de dados citadas na metodologia, elaborou-se uma revisão bibliográfica.

### **4.2.1 *Panorama mundial da produção de milho***

O milho (*Zea mays*) possui destaque por ser o grão mais produzido mundialmente, alcançando grande relevância social e econômica. A sua produção mundial entre as safras de 2019 e 2020 foi de 1,11 bilhões de toneladas. Já entre as safras de 2020 e 2021, esse número chegou a 1,18 bilhões de toneladas. O grão também é o mais consumido no mundo, sendo que na safra de 2019/20 esse consumo foi de 1,12 bilhões de toneladas e na safra 2020/21 o consumo foi de 1,15 bilhões de toneladas. O Brasil é o terceiro produtor mundial de milho, atrás dos Estados Unidos e China. Completam o grupo dos seis maiores, União Europeia, Argentina e Ucrânia. Nas safras de 2021/2022 o Brasil teve uma produção de 117,1 milhões de toneladas, das quais consumiu 76,8 milhões de toneladas e exportou 36,6 milhões de toneladas, estocando o excedente (CONABa, 2020; CONAB, 2019).

A maior parte da produção nacional de milho brasileira é destinada a alimentação animal. Tendo também seu uso destinado para fabricação de amidos industriais que é utilizado para a fabricação de produtos diversos, como papelão ondulado, adesivos e fitas gomadas. No entanto, a partir de 2018, o milho produzido no Brasil ganhou destaque no cenário do comércio mundial, sendo o segundo maior exportador do grão, participando com cerca de 17 % das exportações mundiais, atrás apenas dos Estados Unidos, que detêm cerca de 40 %. Para a safra de 2021/2022 prevê-se um aumento de 1,6 % na área plantada e uma produção de 116,3 milhões de toneladas. Estes dados mostram a crescente da produção do grão, indicando ser

um grão promissor ao seu uso como matéria-prima (SOLOGUREN, 2015; GUTH, 2019 e CONABa, 2020).

#### *4.2.2 Histórico do etanol de cana-de-açúcar no brasil e início da sua produção a partir do milho*

Na década de 1970, surgiu a chamada crise do petróleo, que foi decorrente à elevação preços do petróleo a nível mundial em consequência da ação da Organização dos Países Exportadores de Petróleo (OPEP) composta principalmente pelos países produtores de petróleo do Oriente Médio. Os preços correntes do petróleo cru no mercado mundial, passaram de 1,9 dólares o barril, em 1972, para 11,2 dólares o barril, em 1974, uma alta superior a 550 %. Esse aumento vertiginoso dos preços do petróleo, nesse período, incidiu sobre a dívida externa líquida que foi agravada pelas importações crescentes de petróleo que passaram de 711 milhões de dólares em 1973, chegando a 2.875 bilhões de dólares em 1975 (CARVALHO e CARRIJO, 2007).

Assim, os incentivos mundiais para a produção de etanol foram intensificados em decorrência dessa crise do petróleo e dos baixos valores do açúcar de cana-de-açúcar. Ao mesmo tempo, preocupações econômicas e ambientais foram levantadas sobre as consequências de altas emissões de gases de efeito estufa e da dependência de combustíveis fósseis (MÜLLER *et al.*, 2019).

Em meio a essa crise de combustíveis fósseis, o governo brasileiro passou a buscar formas alternativas para reduzir a dependência do país a esses combustíveis e amenizar os efeitos do choque na economia brasileira. Com a deterioração do balanço de pagamentos e aumento da inflação, causados pelo preço elevado do petróleo, o Brasil, que importava 80 % da sua necessidade, passou a buscar formas alternativas renováveis de combustível. Vários programas foram propostos, e o que mais logrou êxito foi o Programa Nacional do Álcool - Proálcool, lançado em 1975, que visava a produção de álcool anidro de cana-de-açúcar, em destilarias anexas as usinas, para ser adicionado à gasolina. Através da Petróleo Brasileiro S/A - PETROBRAS, o programa ganhou força, recebendo subsídios e financiamentos públicos e auxílio na compra, transporte, armazenamento, distribuição e mistura do álcool à gasolina, e a determinação do preço de venda do produto (MICHELLON, SANTOS e RODRIGUES, 2008).

Até o final dos anos 90, houve um aumento produtivo, entretanto, o programa declinou em decorrência da desvalorização do preço do petróleo, aumentando a competitividade da gasolina no mercado. Mesmo possuindo subsídios para sua produção, o etanol declinou em virtude dos altos preços ofertados ao consumidor final. Foi somente com a regulamentação da tecnologia dos automóveis total *flex* (ou veículo de combustível duplo), criada ainda na década de 90, que a produção de etanol hidratado voltou a crescer (FRANÇA FILHO, 2018). Com esse aumento o Brasil manteve a liderança mundial na produção de etanol até o ano de 2004. Em 2020, o Brasil alcançou um total de 32,6 bilhões de litros provenientes da cana-de-açúcar e do milho (MÜLLER *et al.*, 2019; EPE, 2021).

Em decorrência das discussões sobre políticas ambientais e em paralelo com o crescimento da produção brasileira, os Estados Unidos também obtiveram crescimento de sua produção de entre 2000 e 2017, tornando-se líder mundial utilizando o milho como principal matéria-prima, produzindo 60,56 bilhões de litros em 2018. A terceira posição na produção de etanol pertence à União Europeia, com 1,15 bilhões de galões em 2017, tendo como principais matérias-primas a beterraba sacarina, milho e trigo (MÜLLER *et al.*, 2019; NOVA CANA, 2019).

Com o controle do preço dos combustíveis praticadas pelo governo afim de controlar a inflação, a partir de 2008, houve aumento do preço do etanol. Em consequência disto, as usinas sofreram perdas que refletiram na redução dos investimentos nas lavouras de cana-de-açúcar, como a não renovação da lavoura e não fertilização do plantio. Assim, foi necessário ao setor sucroalcooleiro, buscar novas alternativas. Empresários do ramo e representantes do setor agrícola e industrial buscaram conhecer o modelo americano de produção de etanol, que utiliza o milho como matéria-prima. Para tanto, fizeram ciência das normas, métodos e procedimentos da fabricação desde combustível, bem como investiram nos parques industriais *flex*, cuja tecnologia permite a integração das produções de cana e milho na mesma estrutura fabril dando início à produção brasileira de etanol de milho no ano de 2012 (FREITAS e MIURA, 2018; FRANÇA FILHO, 2018).

Para produzir etanol de milho, as usinas atuam com três distintas formas de produção. As usinas do modelo *full* produzem o combustível apenas tendo o milho como matéria-prima e utilizam cavaco de eucalipto para cogeração de energia no processo industrial. Além das usinas *full*, existem também mais dois modelos que adotam tanto a cana-de-açúcar como o milho para a produção de etanol: o primeiro,

são as *flex*, usinas de cana-de-açúcar que optam por instalar uma pequena estrutura junto à atual planta para o uso e aproveitamento de equipamentos e sistemas. Nesse sistema, o milho é usado somente na entressafra. O segundo modelo, é o *flex fuel*, muito semelhante ao anterior, mas que, se diferencia pela presença de equipamentos adicionais, específicos para o milho, que tornam a moagem do grão possível, também, fora do período da entressafra (NEVES, 2021).

O Brasil tem enorme potencial para se tornar o líder da produção mundial de combustíveis renováveis, podendo no futuro ditar o preço de mercado, uma vez que o país possui abundância de terra e mão-de-obra, além de possuir o menor custo de produção do álcool no mundo. Para que se torne possível essa nova colocação do país no ranking mundial, faz-se necessário uma operação conjunta entre empresários do setor e governo para extinguir potenciais entraves e problemas oriundos dessa nova expansão do programa Proálcool, usufruindo todos os benefícios que podem ser gerados (CARVALHO e CARRIJO, 2007; MICHELLON, SANTOS e RODRIGUES, 2008).

#### 4.2.3 Dados da produção de etanol de milho

Inúmeras biomassas podem ser utilizadas na produção de etanol, tais como cana-de-açúcar, madeira, arroz, palhas diversas, entre outros (SILVA e SERRA, 2017). Destaca-se entre elas o milho, uma matéria-prima amilácea, que é uma das culturas mais produzidas no mundo. Esse sucesso produtivo da cultura do milho se deve as condições climáticas favoráveis e a utilização de materiais com genética de alta performance (ROSSETO *et al.*, 2017).

O uso do milho na produção do etanol evidenciou vantagens, pois o grão permite maior período de armazenamento podendo ser utilizado à medida das necessidades da indústria, o que não acontece com a cana, que precisa ser processada logo após sua colheita (DALL'AGNOL, 2017). Além disso, possui facilidade no transporte e a produção em regiões mais distantes das usinas, além de fornecer no processo industrial coprodutos comercializáveis, como o óleo de milho e os grãos secos de destilaria (do inglês, *dried distillers grains* - DDG), que consiste em um resíduo da extração de amido com cerca de 30 % de proteína bruta, que pode ser utilizado na fabricação de ração animal, ajudando a alimentar o grande plantel de

aves, bovinos e suínos. Os preços baixos e a abundância da matéria-prima são outros fatores de grande relevância.

Outro ponto de grande relevância do uso do milho na produção de etanol é que esta pode ser realizada no período entressafra da cana-de-açúcar, entre dezembro e março, minimizando a ociosidade e reduzindo os custos fixos da estrutura industrial, por meio da sinergia gerada pela operação conjunta da mão-de-obra e de outros fatores de produção nas indústrias *flex* (FRANÇA FILHO, 2018). Além disso, também ajuda na desova dos excedentes de produção do milho, evitando a pressão dos preços para baixo e reduzindo o custo com o transporte para os portos. Serve, também, como solução para a falta de espaço de armazenagem em períodos de supersafras, em que há a necessidade de acúmulo em decorrência do desinteresse do produtor em comercializar o produto a baixo preço (DALL'AGNOL, 2017).

Além do aumento crescente das unidades de produção *flex*, há o implemento de novas unidades de produção do tipo *full*, além da consolidação das indústrias já existentes. Atualmente, dezessete usinas de etanol de milho estão em operação no Brasil, sendo oito *full* e nove *flex*. A previsão para o ano de 2030 é de que serão implementadas mais nove usinas, sendo cinco utilizando o sistema *flex* e quatro do tipo *full*. Também, se prevê aumentar a capacidade de produção das usinas já existentes que, em 2021 tiveram um total de processamento de milho foi de 14,0 milhões de toneladas e a de produção de etanol de cerca de 3,5 bilhões de litros/tonelada (EPE, 2021).

Segundo estimativas da UNEM (2020) é previsto a produção de 3,6 bilhões de litros de etanol de milho no Brasil em 2023, o que representa um aumento de 471 % em relação aos números apresentados pela CONAB (2020b) em 2020, de 1,7 bilhões de litros. A mesma produção deve crescer cerca de 400 % até 2028 (NEVES *et al.*, 2021).

Os principais estados que se destacaram na produção de etanol de milho são Mato Grosso com capacidade produtiva de cerca de 2,5 bilhões de litros de etanol de milho por ano. Seguido pelo estado de Goiás, que possui capacidade produtiva de 513 milhões de litros, principalmente em função da adoção das usinas de cana-de-açúcar ao modelo *flex*. Outros estados que também se destacam são Paraná e São Paulo, com previsão de expansão produtiva (NEVES *et al.*, 2021). O Quadro 1 mostra a produção de etanol de milho por regiões, com destaque para alguns estados.

**Quadro 1 - Produção de etanol de milho por regiões com destaque para alguns estados**

<b>ETANOL DE MILHO</b> (mil litros)		
<b>Região/Estado</b>	<b>Safra 2018/19</b>	<b>Safra 2019/20</b>
<b>Norte</b>	-	<b>4.673</b>
RO	-	4.673
<b>Centro-Oeste</b>	<b>781.862</b>	<b>1.565.160</b>
MT	590.994	1.269.485
GO	190.868	295.675
<b>Sudeste</b>	-	<b>17.565</b>
SP	-	17.565
<b>Sul</b>	<b>9.569</b>	<b>88.165</b>
PR	9.569	88.165
<b>Norte/Nordeste</b>	-	<b>4.673</b>
<b>Centro sul</b>	<b>791.431</b>	<b>1.670.890</b>
<b>Brasil</b>	<b>791.431</b>	<b>1.675.563</b>

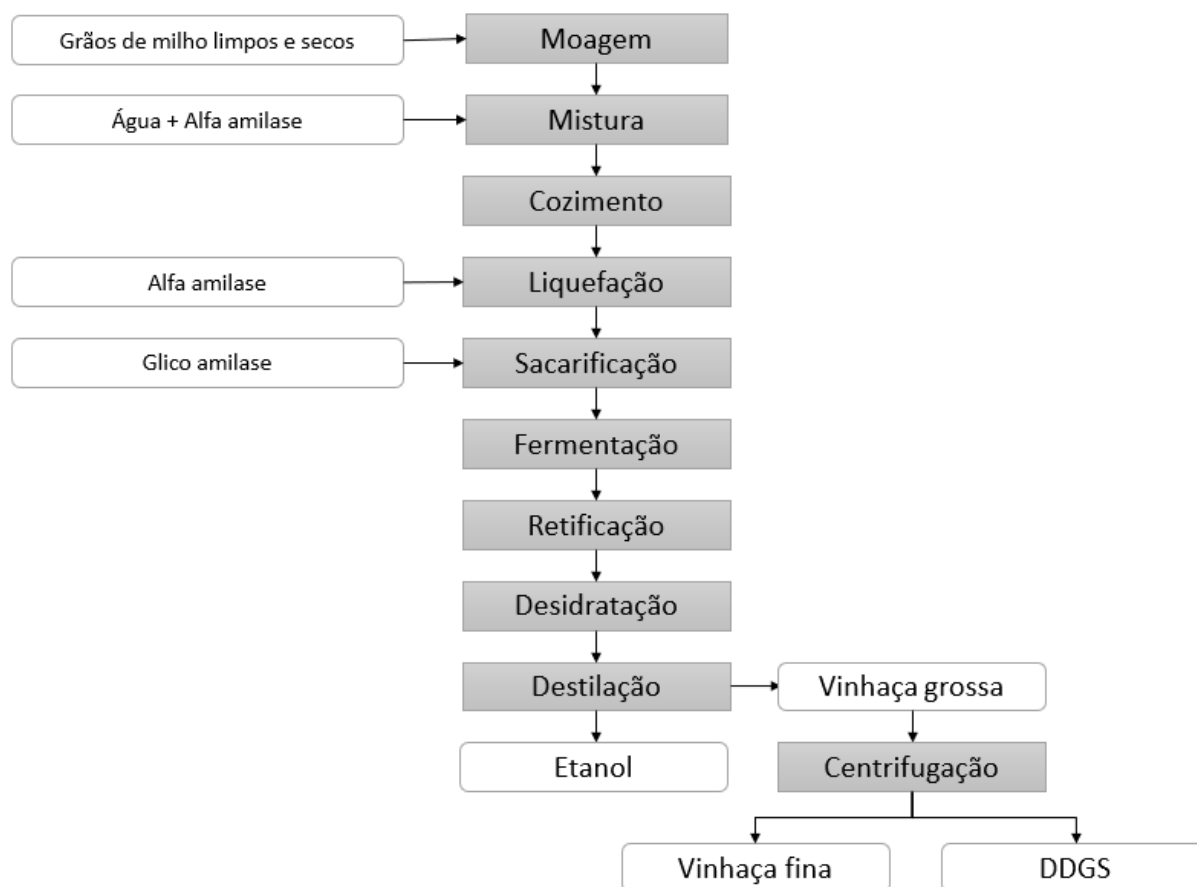
Fonte: Neves et al. (2021).

#### 4.2.4 Processo de produção de etanol de milho

O grão do milho contém grandes moléculas de polissacarídeos (amido), que são carboidratos constituídos de unidades de glicose, que interagem entre si e formam pacotes compactados de carboidrato com baixa solubilidade em água. O processamento do milho para a produção de etanol envolve uma etapa de quebra da molécula de amido em moléculas menores de açúcares solúveis. Tais açúcares posteriormente fermentados dão origem ao etanol (PEREIRA, 2017).

O etanol de milho pode ser produzido por meio de dois processos: moagem úmida ou seca. A opção úmida foi a mais utilizada até a década de 90, porém, a moagem seca apresenta algumas vantagens comparativas importantes, como menor custo operacional e maior rendimento final. Na via seca, o grão de milho é separado em frações, o que possibilita a recuperação de diversos produtos, como proteínas, nutrientes, amido e o óleo (NOVOZYMES, 2002). O fluxograma da moagem a seco para produção de álcool anidro é apresentado na Figura 1.

**Figura 1 - Fluxograma de produção de etanol anidro de milho por via seca e geração de coprodutos**



**Fonte: Autora (2022).**

A primeira etapa da produção do etanol pelo processo de moagem a seco se dá pelo recebimento do milho, que passa por um processo de limpeza, secagem e armazenamento. Já limpos, os grãos são submetidos ao processo de moagem, no qual são triturados em moendas ou moinho de martelo, e se tornam um produto denominado farinha (ROSENTRATER, 2014).

Esta farinha é misturada com água e a mistura é acrescida de alfa-amilase, que inicia o processo de transformação da amilopectina e amilose em glicose, que é o açúcar fermentescível. Então, a mistura é cozida em vapor (ROSENTRATER, 2014).

A próxima etapa do processo é a liquefação, seguido pela etapa de hidrólise do amido ou sacarificação, processo onde acontece a transformação do amido residual em açúcares fermentescíveis. A moagem, o cozimento e a liquefação liberam e convertem o amido de milho em glicose, que é consumido durante o processo de fermentação pela levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) (ROSENTRATER, 2014).

Após, inicia-se o processo de fermentação e, após a finalização todo o conteúdo da dorna passa pelas etapas de retificação, cuja finalidade é livrar o etanol

das impurezas voláteis contidas no flegma e, em seguida, pela desidratação (FUGITA, 2014). Diferentemente da produção de álcool a partir da cana-de-açúcar, a levedura não pode ser separada do caldo fermentado devido à natureza física do mosto de milho, mais denso e com material sólido em suspensão.

O processo de destilação ocorre em três colunas de separação. No topo da coluna é retirado o álcool hidratado e no fundo a vinhaça ou vinhoto contendo 5 a 15 % de sólidos que contém os resíduos do milho e as células mortas de levedura. Essa vinhaça é centrifugada, sendo que a parte sólida deste processo, os grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS) possui a sua destinação final como ração animal. A vinhaça obtida neste processo contém alta concentração de proteína e 5 a 10 % de sólidos totais (MARQUES e CUNHA, 2008 GRIPPA, 2012; BORTOLETTO e ALCARDE, 2015; PEREIRA, 2017; BELLUCO e ALCARDE, 2019).

#### 4.2.5 Vinhaça

O nome vinhaça é empregado indistintamente para o resíduo da destilação de uma solução alcoólica chamada vinho, obtida do processo de fermentação alcoólica sendo um dos vários subprodutos que são gerados pela indústria sucroalcooleira. O vinho é o produto ou subproduto da fermentação alcoólica obtido a partir de uma solução açucarada chamada mosto. Este mosto pode ser obtido do suco de vários produtos agrícolas como uva, frutas, beterraba, cana-de-açúcar ou do próprio açúcar, mel e melaço da indústria canavieira. A palavra vinhaça é derivada da palavra vinho; assim como a palavra flegmaça derivou seu nome do flegma, uma solução hidroalcoólica de aproximadamente 40 a 50 °GL a ser retificada. Indiscriminadamente, o resíduo do vinho e a mistura dos resíduos do vinho e flegma, são chamados de vinhaça. Esta pode receber outras denominações, como vinhoto, restilo, garapão e outras denominações regionais. Este resíduo aumenta proporcionalmente com o aumento de produção de etanol no mundo (ELIA NETO, 2016; ARAUJO e OLIVEIRA, 2016; MEDEIROS *et al.*, 2017).

A composição quantitativa da vinhaça varia em função do tempo, índice de maturação, tipo de solo e da matéria-prima utilizada para produção de etanol, sistema de fermentação, tipo de levedura utilizada, tipo de tratamento das leveduras, aditivos utilizados na fermentação, aparelhos utilizados na destilação, qualidade da água

usada, componentes utilizados para desinfecção e natureza e composição da matéria-prima (ARAUJO e OLIVEIRA, 2016).

A vinhaça pode ser caracterizada por apresentar alto poder poluente e valor fertilizante; o poder poluente, cerca de cem vezes maior que o do esgoto doméstico, decorre da sua riqueza em matéria orgânica, sendo que o valor da sua demanda química de oxigênio (DQO) pode chegar próximo de 100 g/L. É definida como líquido de cor parda clara, que escurece em razão da oxidação, resultante do processo de fermentação, pH variando de 3,7 a 5, elevada corrosividade e índices de demanda biológica de oxigênio (DBO) e DQO. Devido à sua elevada carga de matéria orgânica ela auxilia na proliferação de vetores de doenças e gera forte odor na sua decomposição (FUESS, 2013; ARAUJO e OLIVEIRA, 2016).

Em geral, a vinhaça é composta por 93 % de água e 7 % de constituintes sólidos. Desses sólidos, cerca de 75 % são substâncias orgânicas e o restante (25 %) são minerais. Devido à alta temperatura que a vinhaça sai do processo de fermentação, esta não apresenta microrganismos patogênicos (SAPLA, 2012).

Além de elevada concentração de matéria orgânica, a vinhaça contém concentrações apreciáveis de macro e micronutrientes, bem como características ácidas e corrosivas, resultantes de processos relacionados ao preparo da matéria-prima para a fermentação. Isto pode causar grandes problemas ambientais, já que sua produção atinge a proporção de cerca de 10 litros para cada litro de álcool produzido pelos processos convencionais de fermentação etanólica utilizados no Brasil. Entretanto, pode chegar a 20 litros dependendo do tipo de matéria-prima e do nível de tecnologia utilizados na fermentação (FUESS, 2013; MEDEIROS *et al.*, 2017).

O principal problema da vinhaça refere-se ao seu elevado potencial poluente, associado às características previamente mencionadas. Em vinhaças geradas a partir do processamento de grãos de cereais verifica-se um maior conteúdo proteico, fato que acarreta maiores concentrações de nitrogênio. Já no caso do emprego de matérias-primas açucaradas, tais como a cana-de-açúcar e a beterraba, é comum a presença de elevadas concentrações do íon sulfato na vinhaça devido à correção do pH do mosto (solução de açúcares) com ácido sulfúrico (FUESS, 2013). A Tabela 2 enumera algumas características da vinhaça de etanol de milho.

**Tabela 2 - Composição da vinhaça gerada a partir do etanol de milho**

<b>Parâmetro</b>	<b>Quantidade</b>
Sólidos Totais	6.5 – 8.8 %
Amido residual	0,07-0,20 p/v
Açúcar total	0,19-0,31 p/v
Açúcar redutor	0,05-0,17 p/v
Açúcar redutor como glicose	2.1 ± 0.1 g/L
Carboidratos como glicose	20.5 ± 0.2 g/L
Fosfatos totais	129,41-140,27 mg/L
Ácidos totais	0,252-0,487 g/L
Aminoácidos totais	0,051-0,096 g/L
pH	4.5 ± 0.2
Fósforo total	1.6 ± 0.1 g/L
Nitrato	44.0 ± 0.6 mg/L
Amônia	35.0 ± 3.0 mg/L

**Fonte: Erickson (2012).**

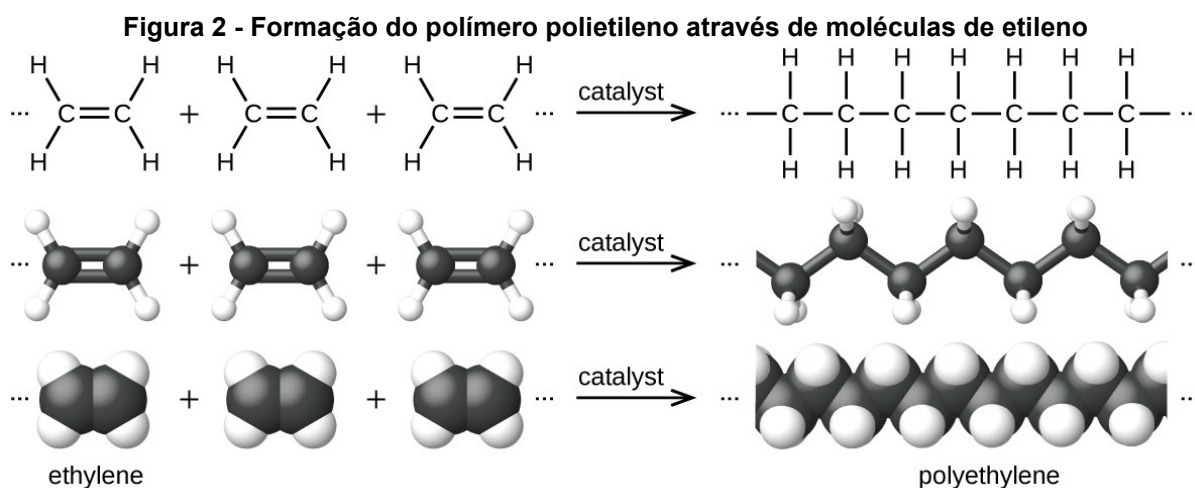
Muitas vezes, a destinação para a vinhaça é a fertirrigação, que apesar de comum, pode causar problemas ambientais. A aplicação indiscriminada da vinhaça no solo intensifica a sua salinização, acarreta contaminação dos recursos hídricos por excesso de nutrientes, ocasiona contaminação por metais (incluindo os pesados), provoca emissões de gases de efeito estufa e causa contaminação de águas subterrâneas. Esses problemas causados pela indiscriminada disposição de vinhaça no solo, rios, lagos e aquíferos tem recebido a atenção desde a década de trinta no Brasil. Para tanto, procurou-se de forma legal minimizar e impedir esta prática (FUESS, 2013; ARAUJO e OLIVEIRA, 2016).

A biotecnologia é uma das ferramentas disponíveis para expungir este problema, buscando aplicações biotecnológicas que possam, de forma sustentável, desenvolver produtos aplicando o uso da vinhaça como substrato.

#### **4.2.6 Biopolímeros**

A palavra polímero origina-se do grego poli (muitos) e mero (unidades de repetição). Um polímero consiste em uma macromolécula formada por várias unidades de moléculas com uma única repetição (monômeros), que se unem por ligações covalentes. Estes podem ser divididos em três classes principais: plásticos, borrachas e fibra, que são classificados de acordo com o tipo de monômero, tamanho da cadeia e o tipo de ligação covalente. Para que um polímero se forme, é necessário

que cada monômero seja capaz de se combinar, no mínimo, com outros dois monômeros, através de pelo menos, dois pontos reativos. A bi-funcionalidade pode ser obtida com a presença de grupos reativos e/ou duplas ligações reativas (FONSECA, 2014). A Figura 2 mostra a formação do polímero polietileno através de moléculas de etileno.



Fonte: OpenStax (2022).

Os biopolímeros são polímeros ou copolímeros produzidos a partir de matérias-primas de fontes renováveis e podem ser divididos em três categorias, com base nos seus processos produtivos e matérias-primas:

- i. Biopolímeros naturais: extraídos diretamente da natureza, como carboidratos de plantas (amido, celulose, alginato, ágar etc.) e de origem animal ou vegetal como proteína de soja, glúten de trigo, gelatina, colágeno etc.
- ii. Polímeros sintéticos biodegradáveis, produzidos por síntese química usando monômeros de fonte renovável. Exemplo: poliácido láctico (PLA), um biopoliéster polimerizado a partir de ácido láctico e monômeros, que podem ser produzidos pela fermentação de carboidratos.
- iii. Biopolímeros produzidos por fermentação microbiana (incluindo microrganismos geneticamente modificados), tais como poli(hidroxialcanoato) (PHA) e poli(hidroxibutirato) (PHB) (COLTRO, 2015; BRITO *et al.*, 2011; FONSECA, 2014).

As fontes renováveis utilizadas na fabricação dos biopolímeros possuem um ciclo de vida mais curto comparado com fontes fósseis como o petróleo que leva

milhares de anos para se formar. O crescente interesse por biopolímeros possui motivações ambiental e socioeconômica, pois estes não geram grandes impactos ambientais causados pelos processos de extração e refino utilizados para produção dos polímeros provenientes do petróleo, que é limitada e gera constantes aumentos no preço desse tipo de polímero. Outro fator preponderante é a não biodegradabilidade da grande maioria dos polímeros produzidos a partir do petróleo, que contribui para o acúmulo de lixo plástico sem destino apropriado que levará de dezenas a centenas de anos para ser novamente assimilado pela natureza (BRITO *et al.*, 2011).

Os biopolímeros possuem propriedades químicas e físicas únicas ou superiores às dos polissacarídeos tradicionais, como por exemplo, a alta viscosidade, o maior poder gelificante, a compatibilidade com uma grande variedade de sais em ampla faixa de pH e temperatura, a estabilidade em elevadas concentrações iônicas, a alta solubilidade em água e, também, a ação sinérgica com outros polissacarídeos (ARAÚJO, 2014). Além disso, apresentam vantagens em relação aos polissacarídeos de origem vegetal e animal, tais como reprodutibilidade e estabilidade das propriedades físico-químicas e custo e suprimento estáveis (BORGES *et al.*, 2004).

Alguns biopolímeros apresentam grande potencial para substituição, em determinadas aplicações, de polímeros provenientes de fontes fósseis podendo ser usados para a produção de todos os tipos de embalagem (bandejas, copos, garrafas, filmes-monocamadas, laminados e compósitos etc.) usando os mesmos equipamentos e técnicas de processamento utilizados para os polímeros convencionais, desde que sejam feitos os devidos ajustes das máquinas de acordo com as propriedades reológicas do polímero em processamento. Entretanto, essas aplicações dependem das propriedades mecânicas, térmica, de barreira a gases e ao vapor d'água (COLTRO, 2015).

Apesar de todas as vantagens, os biopolímeros possuem algumas limitações técnicas que tornam difícil sua processabilidade e seu uso como produto. Assim, muitos grupos de pesquisa vêm se dedicando ao estudo da modificação dos biopolímeros para viabilizar o processamento e uso deles em diversas aplicações. Para isso, blendas, compósitos e nanocompósitos, têm sido estudados no intuito de melhorar propriedades como processabilidade, resistência térmica, propriedades mecânicas, propriedades reológicas, permeabilidade a gases e taxa de degradação (BRITO *et al.*, 2011).

#### 4.2.6.1 Biopolímeros obtidos por processos fermentativos

Os biopolímeros obtidos pelo processo fermentativo se tornam interessantes, pois possuem capacidade de formar soluções viscosas e géis em meio aquoso, mesmo quando aplicados em baixas concentrações. Muitos microrganismos produzem grandes quantidades de polissacarídeos sob as mais diversas condições, uma vez que esses polissacarídeos possuem papel específicos como compostos de armazenamento (glicogênio), compostos estruturais (quitina), mediadores das interações do microrganismo com o meio ambiente (polissacarídeos extracelulares). Os microrganismos produzem esses polissacarídeos como forma de sobrevivência, desempenhando papéis como: proteção contra desidratação; servindo de barreira, impedindo que vírus e anticorpos se ligam a sítios específicos sobre a parede celular; acoplamento e neutralização de toxinas carregadas ou íons metálicos tóxicos; atuação como fonte de carbono e energia, entre outros (PAULO, 2014).

A aplicação de biopolímeros de origem microbiana tem sua produção sendo largamente pesquisada, tendo em vista o potencial de aplicação para diferentes setores. Também possuem a vantagem de poderem ser obtidos a qualquer época do ano, pois a produção pode ser controlada, sendo assim, independente dos fatores que alteram o custo de produção de biopolímeros tradicionais. Outra vantagem é o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular que permitem obter polissacarídeos microbianos com propriedades específicas, as quais ainda não são possíveis nos vegetais (ARAÚJO, 2014).

Os microrganismos produzem polissacarídeos de três formas distintas: intracelulares, integrantes da parede celular e extracelulares (exopolissacarídeos - EPS). Os EPS, podem, ainda, ser classificados em dois tipos: cápsulas integradas com a parede celular (capsular) ou gomas acumuladas no lado de fora da parede celular e difundidas no meio de cultura (livres). Os EPS despertam maior interesse porque podem ser recolhidos diretamente do meio para o qual são secretados (ARAÚJO, 2014).

#### 4.2.6.2 Polihidroxialcanoatos

Os polihidroxialcanoatos (PHA's) são poliésteres de origem natural, produzidos por uma larga variedade de bactérias a partir de materiais de reserva intracelular de microrganismos sendo passíveis de ser sintetizados por mais de 90 gêneros diferentes de microrganismos, chegando a acumular, em alguns casos, cerca de 90 % de seu peso seco em biopolímero. Também são sintetizados por algumas plantas ou fungos, embora o rendimento seja menor. Estão presentes no citoplasma das células sob a forma de grânulos rodeados por uma membrana (LUVIZETTO, 2007; FONSECA, 2014; HASSEMER, 2016). São termoplásticos e apresentam alto grau de polimerização, cristalinos, opticamente ativos, insolúveis em água, biocompatíveis e vêm sendo reconhecidos como potenciais substitutos para os plásticos convencionais derivados do petróleo (FONSECA, 2014; ALVES, 2016).

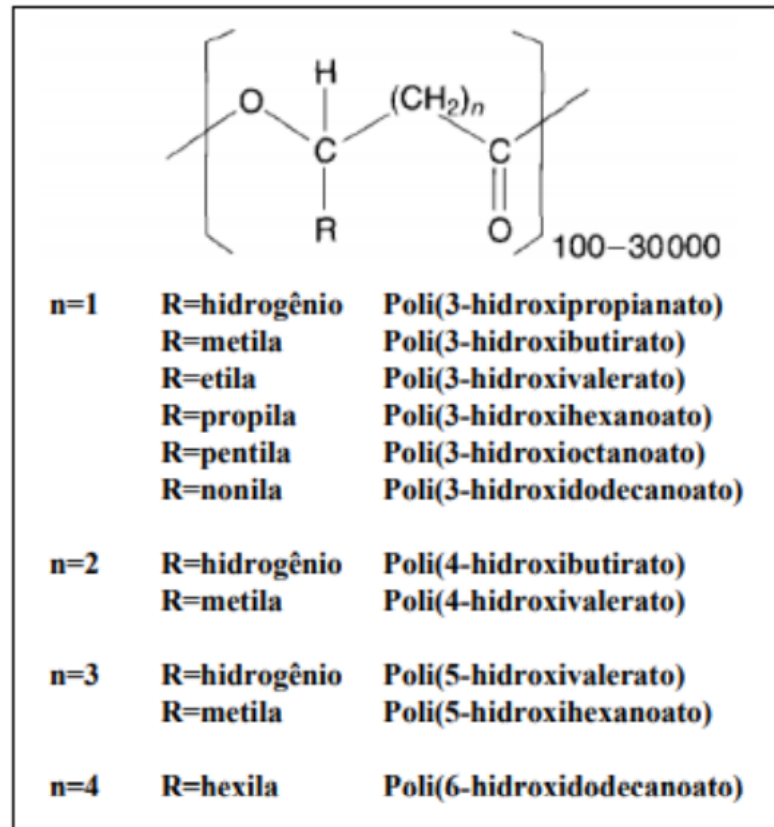
A sua característica mais importante é a biodegradabilidade. As bactérias que acumulam polímero possuem uma enzima, a PHA depolimerase, capaz de degradar o polímero que se encontra dentro da célula para utilizá-lo como fonte de carbono. Porém, com esta enzima, não é possível degradar o polímero depois de retirado das células, possivelmente devido à mudança do estado amorfo para cristalino. Mas existem muitos microrganismos que possuem uma PHA depolimerase extracelular, capaz de degradar o biopolímero depois de retirado da célula, utilizando-o como fonte de carbono. Os fatores que influenciam o tempo de biodegradação podem ser relacionados ao ambiente (temperatura, umidade, pH e disponibilidade de nutrientes) ou relacionados ao biopolímero (composição, cristalinidade, aditivos, espessura e área superficial). A biodegradação ocorre na superfície por hidrólise enzimática. A biodegradação de PHAs em condições aeróbias resulta em dióxido de carbono e água, enquanto, sob condições anaeróbias, resulta em dióxido de carbono e metano. PHAs são compostáveis em um grande intervalo de temperatura, sendo a máxima próxima a 60 °C, com um nível de umidade de 55 % (BISSACOT, 2018).

A primeira produção em escala industrial deste biopolímero ocorreu em 1982 pela empresa *Imperial Chemical Industries* (ICI), sendo comercializado com o nome de Biopol. Em meados da década de 90, teve início no Brasil o desenvolvimento de tecnologia para a produção de plásticos biodegradáveis e biocompatíveis empregando matéria-prima renovável de origem vegetal, em especial derivada da cana-de-açúcar, a partir de um projeto cooperativo desenvolvido pelo Instituto de Pesquisas

Tecnológicas (IPT), Copersucar e Universidade de São Paulo. Pesquisas levaram o projeto a selecionar um grupo de polímeros da família dos polihidroxialcanoatos (PHA) que podem ser produzidos por bactérias em biorreatores a partir de alguns carboidratos (ARAÚJO, 2005). O baixo custo da produção de açúcar no país, juntamente com o excedente energético das usinas de açúcar e álcool, viabilizou a produção integrada desses polímeros no Brasil. Com isso, foi inaugurada em setembro de 2000 a PHB Industrial, uma empresa que produzia e comercializava plástico biodegradável tipo P(3HB) sob o nome Biocycle® que atuou até 2015 em escala piloto chegando a exportar o polímero para o Japão. Atualmente, a planta industrial encontra-se desativada (ALVES, 2016).

As características dos diferentes PHA's variam conforme a sua composição monométrica, podendo variar de plásticos rígidos e cristalinos, a plásticos flexíveis com boas propriedades de impactos, a fortes elastômeros, o que depende do tamanho do grupo alquila, R, bem como da composição do polímero (FONSECA, 2014). Podem exibir um grau de polimerização de até 30.000, confirmado pelas elevadas massas molares. Com o aumento no comprimento da cadeia, ou aumento no número de comonômeros em um copolímero, sua elasticidade aumenta (RAICHER, 2011). A fórmula estrutural do das diferentes variações dos PHA's são apresentados na Figura 3, na qual o grau de polimerização (n) pode variar de 100 a 30.000 vezes (BORGES, 2017).

**Figura 3 - Estrutura geral de PHA's e seus respectivos representantes**



Fonte: LUVIZETTO (2007).

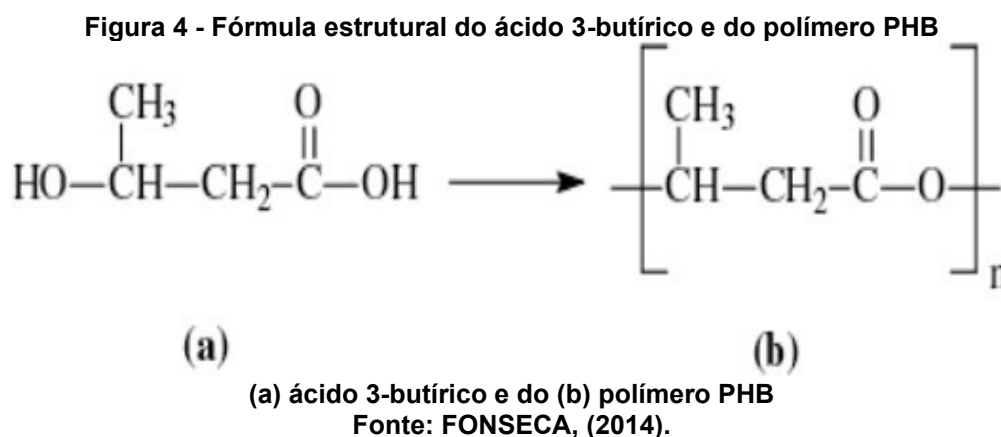
Dois grupos distintos de bactérias são capazes de sintetizar PHAs. O primeiro grupo necessita da limitação de algum nutriente como nitrogênio, oxigênio, magnésio, potássio, fósforo etc. e excesso de fontes de carbono (*Bacillus megaterium*, *Cupriavidus metallidurans* e *Pseudomonas oleovorans*) para que ocorra a síntese de PHAs. O segundo grupo engloba as bactérias capazes de sintetizar PHAs ao longo da fase de crescimento exponencial, sem que haja a necessidade de limitação de nenhum nutriente (*Azohydromonas lata*). Para os dois grupos, os PHAs ficam armazenados sob a forma de grânulos amorfos e osmoticamente inertes no interior da célula (HASSEMER, 2016). Existem, atualmente, mais de 150 tipos diferentes de monômeros constituintes dos PHAs em diversas bactérias. Essa variedade traz como vantagem a possibilidade de poder sintetizar polímeros com as mais variadas propriedades mecânicas, o que aumenta as aplicações práticas dos mesmos (FONSECA, 2014; HASSEMER, 2016). Duas características físicas são frequentemente apontadas nos trabalhos relacionados com a produção de PHAs são a massa molecular e as propriedades térmicas. A massa molecular e a distribuição de massas moleculares de um polímero são características importantes para a sua adequação comercial (RAICHER, 2011). Outra característica que aumenta ainda mais

a importância dos PHAs é o fato de que além de serem completamente biodegradáveis, eles ainda são atóxicos e biocompatíveis (HASSEMER, 2016).

Essas características os tornam semelhantes aos polímeros petroquímicos, aumentando ainda mais o interesse do mercado. Outro ponto favorável é o fato destes serem obtidos a partir de fontes renováveis provenientes da agricultura e até mesmo de resíduos industriais. Outra vantagem se relaciona à facilidade de descarte, uma vez que podem ser depositados nos aterros sanitários sem que interfiram na decomposição de outros materiais presentes no lixo e podem ser misturados à matéria orgânica e aproveitados como fertilizantes, além de existir a possibilidade de serem reciclados. Apesar do custo elevado da produção dos PHA's ser um entrave na comercialização, algumas empresas produzem estes biopolímeros em diversos países como, por exemplo, nos Estados Unidos, Brasil, Japão e Itália, em alguns casos em escala piloto, mas com intenção de aumento de escala (FONSECA, 2014).

#### 4.2.6.3 Poli(3-hidroxibutirato)

Dentre as diferentes estruturas moleculares possíveis para os PHA, o mais bem caracterizado é o poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB) ou PHB), pois assemelha-se estruturalmente a polímeros de fonte petroquímica largamente utilizados atualmente e que pode ser sintetizado por diversos microrganismos (ARAÚJO, 2005; ALVES, 2016). A estrutura deste polímero e do seu respectivo monômero é representada na Figura 4.



O P(3HB) foi o primeiro PHA a ser descoberto, para o qual os primeiros registros ocorram próximo a 1888 quando Martinus Beijerinck, um microbiologista holandês, visualizou inclusões de PHAs no interior de células bacterianas; e foi

posteriormente isolado e caracterizado por Lemoigne por volta de 1926. Em seu estudo, Lemoigne extraiu de células de *Bacillus megaterium* dois compostos que ele acreditava serem resultado da hidrólise de P(3HB). A composição química destes compostos era idêntica, porém um deles era cristalino, com ponto de fusão de 120 °C enquanto o outro era amorfo e seu ponto de amolecimento se encontrava próximo a 157 °C. Ao fim de sua pesquisa, Lemoigne provou que ambos os compostos eram P(3HB), porém com massas molares diferentes (ARAÚJO, 2005; HANSSNER, 2016).

Em 1958, Macrae & Wilkinson (Apud HANSSNER, 2016) desenvolveram um trabalho envolvendo P(3HB), no qual perceberam que culturas de *Bacillus megaterium* e *Bacillus cereus* armazenavam grânulos de P(3HB) em meios contendo uma alta concentração de fontes de carbono e nitrogênio. Entretanto esses grânulos eram consumidos pelas células à medida que os nutrientes ficavam escassos. Percebeu-se dessa forma que o biopolímero P(3HB) possui função de reserva energética. Durante os trinta anos seguintes, o interesse no P(3HB) ficou restrito à descrição de métodos de detecção e determinação do teor do bioplástico nas células e das condições de cultura que levasse a sua síntese e degradação pelo bacilo. Mas somente em 1973 o estudo do P(3HB) como possível substituto dos polímeros petroquímicos ganhou força devido à crise do petróleo. Estes estudos demonstraram que além de ser possível produzir P(3HB) através de materiais renováveis, algumas propriedades do P(3HB) se assemelhavam às do polipropileno (HANSSNER, 2016; ALVES, 2016).

Em relação às características físico-químicas do P(3HB), sua baixa estabilidade térmica é um grande desafio para sua aplicação industrial, pois reduz a sua processabilidade através de operações unitárias convencionais da indústria de polímeros, como extrusão e injeção. Desta forma o biopolímero apresenta a característica de ser quebradiço, além de apresentar alta temperatura de fusão, que varia entre 170 e 180 °C, sendo que a temperatura de degradação é 190 °C, na qual ocorre o processo de ruptura das cadeias poliméricas. Por isso, o estudo do copolímero polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato P(3HB-co-3HV) é bastante relevante, visto que seu ponto de fusão (do inglês, *melting temperature* -  $T_m$ ) é reduzido à medida que o percentual de hidroxivalerato aumenta na cadeia polimérica. A incorporação de monômeros de valerato e produção do copolímero resulta na formação de um polímero com características industriais mais interessantes, o qual é menos duro e quebradiço. O copolímero também é mais fácil de ser moldado, visto que apresenta menor temperatura de fusão, e pode ser usada para produção de filmes

resistentes ao vapor d'água e gases, propriedade similar ao polipropileno (ARAÚJO, 2005; ALVES, 2016).

Para a produção de P(3HB) tanto em escala industrial quanto para fins de pesquisa, os principais substratos utilizados como fontes de carbono são açúcares e/ou melaços que, apesar de apresentem bons rendimentos, ainda possuem valor agregado, encarecendo o processo. O custo do substrato para a produção de P(3HB) pode, em alguns casos, chegar a até 45 % do custo total do processo (HANSSNER, 2016). O *B. megaterium* é capaz de se desenvolver e acumular P(3HB) utilizando como fonte de carbono de resíduos agroindustriais, considerados substratos de baixo valor agregado, sem necessidade de modificação genética (BORGES, 2017).

Devido às suas características biocompatíveis e à sua biodegradabilidade, o P(3HB) possui grande demanda na área biomédica, sendo utilizado na produção de suturas, curativos, emplastos, pinos ortopédicos, tipoias, *stents* cardíacos, recuperadores de cartilagem, guias nervosas etc. Também apresenta potencial como agente encapsulante e pode ser utilizado em sistemas de entrega de medicamentos ou tratamentos terapêuticos a longo prazo. Na indústria alimentícia, a utilização do biopolímeros está voltada a produção de embalagens, trabalhando com parâmetros tais como a transparência, maleabilidade e resistência e formas de melhorar estas propriedades (usualmente blendagem com poliácido láctico - PLA, ou copolimerização com poli-3-hidroxivalerato) (HANSSNER, 2016).

No Brasil, a empresa PHB Industrial S.A. produziu [P(3HB)] em larga escala a partir da cana-de-açúcar e utiliza uma produção integrada em usina sucroalcooleira. Com essa integração que utiliza sacarose como fonte de carbono, os custos de produção da empresa foram os menores do mundo. Entretanto, ainda possuíam o custo quatro a cinco vezes maior que o custo dos polímeros convencionais.

Para diminuir os custos, uma alternativa interessante é fazer o uso de substratos de menor custo comparados com glicose e sacarose, o que pode representar 40 % de economia no processo de produção. Aliando o uso dessas matérias-primas mais baratas ao estudo de parâmetros do processo fermentativo, pode-se atingir a exploração máxima do potencial dos microrganismos produtores, contribuindo para o aumento da produção do polímero e, consequentemente, para a redução de custo (FIGUEIREDO *et al.*, 2014).

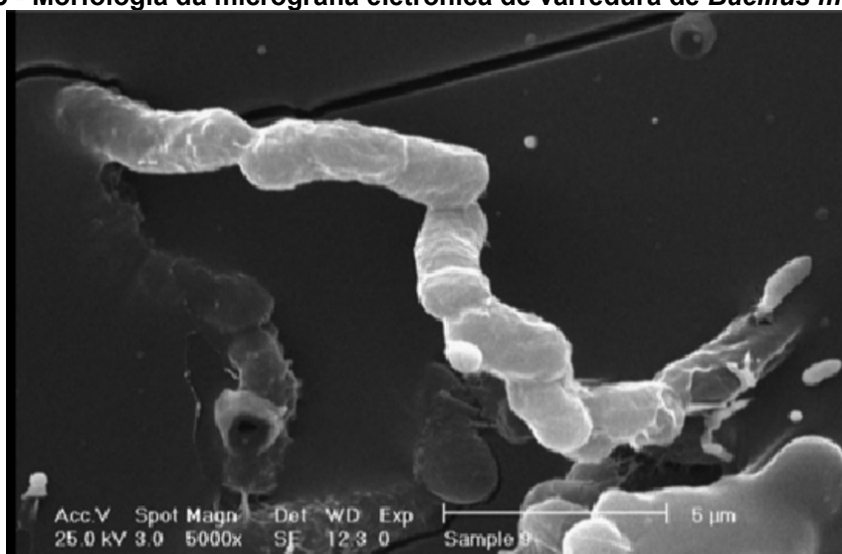
Assim, a reutilização da vinhaça da produção de etanol de milho surge como uma possibilidade de redução dos custos de produção de biopolímero e uma

alternativa de reaproveitar e agregar valor a este resíduo industrial, visto que este é um coproduto que oferece riscos ambientais devido à grande quantidade na qual é gerado, além da escassez de alternativas para reaproveitamento ou descarte.

#### 4.2.7 *Bacillus megaterium*

A bactéria *B. Megaterium* (Figura 5) é Gram-positiva, não móvel, com formato de bacilo, formadora de esporos, e, anaeróbia facultativa, conforme sua linhagem (BERWING, 2016). Pode ser encontrada em diversos habitats como o solo, águas marinhas, sedimentos, cultivos de arroz, mel, pescados e alimentos desidratados. As células de *B. megaterium* apresentam um comprimento próximo a 4  $\mu\text{m}$  e um diâmetro de 1,5  $\mu\text{m}$ , fazendo com que seja considerada uma das maiores bactérias (HASSEMER, 2016). Ela também possui capacidade de produzir polímero de modo associado ao seu crescimento (BERWING, 2016).

**Figura 5 - Morfologia da micrografia eletrônica de varredura de *Bacillus megaterium***



**Fonte: YAZDANI (2009).**

Os microrganismos do gênero *Bacillus* são encontrados no ambiente em grande variedade, entretanto ainda são pouco explorados. Este gênero apresenta características desejáveis para a produção de PHA, como o curto tempo de geração, crescimento fácil que possibilita alcançar uma alta densidade celular, utilização de fontes de carbono e nitrogênio de baixo custo, e ainda exibe tolerância à alta temperatura e alta pressão osmótica. Apresenta também, crescimento rápido e capacidade de se desenvolver em diversas fontes de carbono de baixo custo, bem como secreta grande quantidade de enzimas e não produz endotoxinas (ALVES, 2016; HASSEMER, 2016).

O interesse no estudo do *B. megaterium* surgiu na década de 1960, onde era utilizada para estudos de esporulação, respostas bioquímicas e ação de bacteriófagos, vindo a ganhar mais destaque ao se descobrir a capacidade de produção de proteínas. Além disso ele não apresenta proteases alcalinas, que podem vir a degradar os compostos formados ao longo do cultivo. O *B. megaterium* é muito utilizado na produção de proteínas para a indústria de panificação ( $\alpha$ - e  $\beta$ -amilases) e é capaz de produzir penicilina amidase, composto essencial utilizado na síntese de novos antibióticos a base de  $\beta$ -lactama (HASSEMER, 2016).

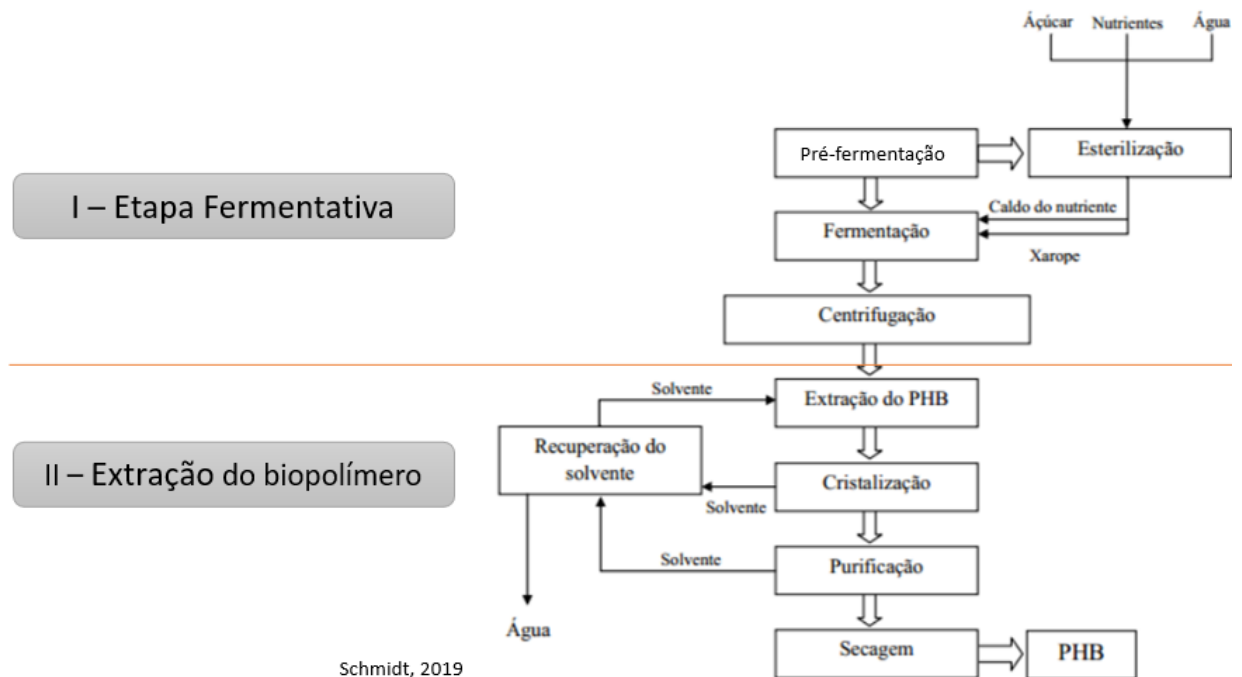
O diferencial no uso de *B. megaterium* em relação a outros microrganismos é a produção de P(3HB) sem limitações de nitrogênio na fase de crescimento. O microrganismo apresenta também bom crescimento e rendimento em mais de 62 fontes de carbono diferentes, incluindo todo ciclo de ácido tricarboxílico, dez intermediários, tornando-se um organismo para a escala industrial (SCHMIDT, 2019).

Esse gênero de bactéria possui muitos empregos industriais, sendo os principais a produção de enzimas e proteínas. Sobretudo, é muito estudada na tentativa de aumentar o acúmulo de polihidroxialcanoatos, testando fontes de carbono alternativas e de baixo custo (ALVES, 2016).

#### 4.2.8 Síntese de P(3HB) por *B. megaterium*

O processo de produção do P(3HB) é dividido em duas etapas: (i) a etapa fermentativa, na qual o microrganismo é cultivado em reatores com o ácido butanoico e a fonte de carbono, em que ocorre a metabolização do açúcar disponível e o acúmulo do P(3HB) no citoplasma da célula; (ii) extração do polímero, na qual o P(3HB) é removido e purificado por meio de processos convencionais como centrifugação ou filtração com solventes adequados até a obtenção do produto final sólido e seco. Um esquema do processo geral está ilustrado no fluxograma apresentado na Figura 6 (SCHMIDT, 2019).

**Figura 6 - Fluxograma de obtenção do PHB**



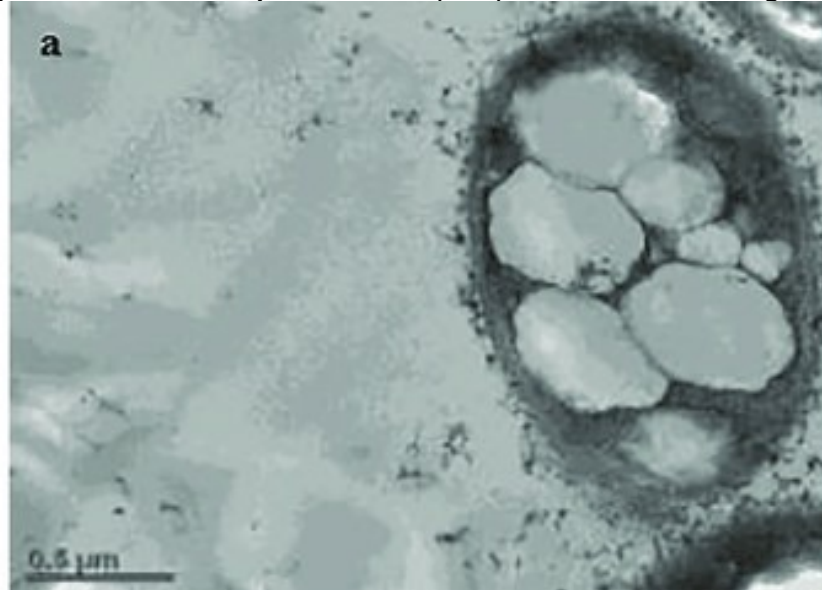
Schmidt, 2019

**Fonte: adaptado de SCHMIDT (2019).**

O metabolismo do microrganismo é direcionado de acordo com o meio no qual encontra-se cultivado. Sua síntese ocorre da seguinte forma: primeiramente, há uma fase de crescimento não limitado com o objetivo de aumentar a quantidade de células, seguida da produção do polímero e seu acúmulo, que ocorre somente em condições de limitação de algum nutriente essencial como P, Fe, Mg, N e O com excesso de carbono. Nessas condições, o microrganismo irá crescer e multiplicar-se rapidamente até o consumo total de carbono inicial e até o esgotamento dos nutrientes essenciais. Na ausência de um destes, o crescimento celular é limitado e o carbono que foi adicionado será convertido em PHA (ALVES, 2016).

Assim ocorre sua produção e armazenado no meio intracelular na forma de grânulos, que podem ser observados por microscopia eletrônica de varredura, como mostra a Figura 7. Em caso do nutriente faltante ser restabelecido, enzimas depolimerazes degradam e metabolizam o polímero como fonte de energia (ALVES, 2016).

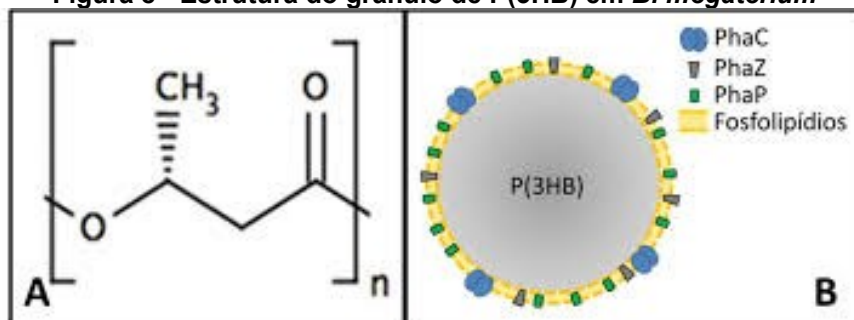
**Figura 7 - Grânulos de polímero do P(3HB) no interior do *B. megaterium***



Fonte: Mohapatra (2020).

Os grânulos intracelulares são recobertos por uma membrana fosfolipídica associada a proteínas com as funções de síntese, despolimerização e regulatória. Dentre estas proteínas encontram-se a enzima PHA sintase (PhaC), a enzima PHA despolimerase (PhaZ), que possui como principal função a degradação do polímero para conversão em fonte de carbono e as PHAsinas (PhaP), que possuem funções regulatórias durante a síntese e formação dos grânulos (Figura 8) (BORGES, 2017 e SANCHUKI, 2017).

**Figura 8 - Estrutura do grânulo de P(3HB) em *B. megaterium***



(A) Estrutura química do poli(3-hidroxibutirato); (B) Representação esquemática dos grânulos de P(3HB) e respectivas proteínas associadas.

Fonte: sanchuki, 2017.

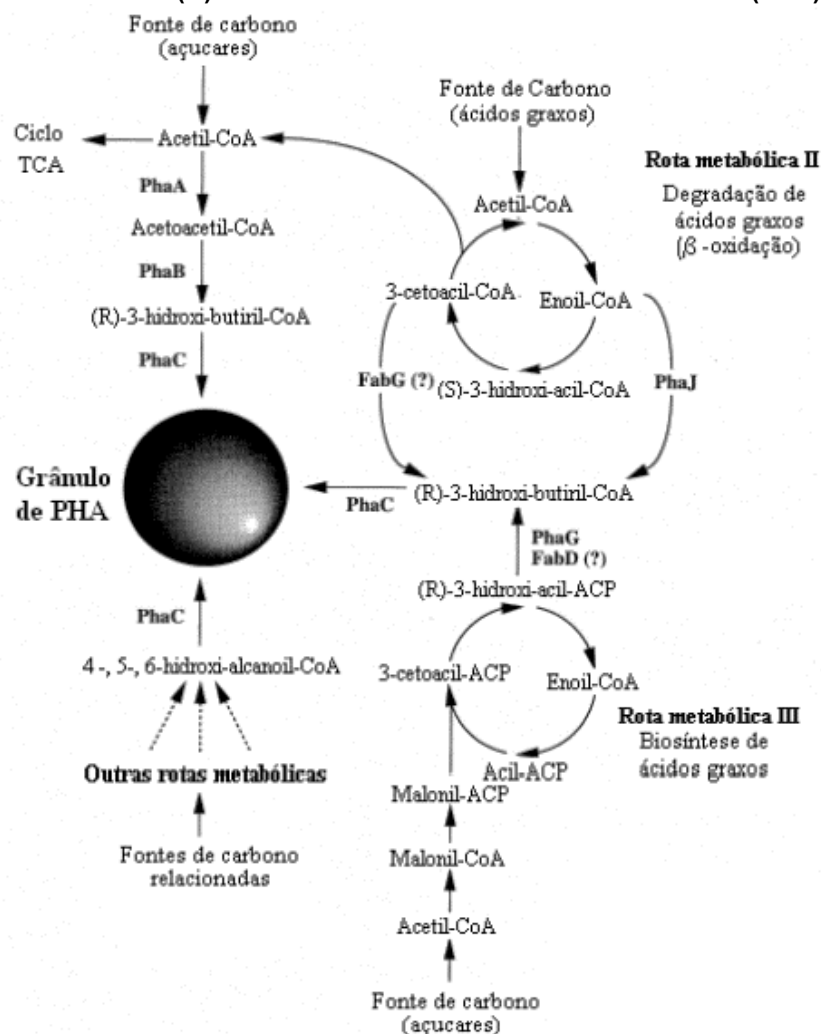
Para que ocorra síntese de P(3HB), inicialmente é necessário ter disponibilidade de fonte de carbono, apropriada para a síntese, no meio de cultura, como é o caso da vinhaça de etanol de milho. Essa fonte tem que permear a parede celular e ficando disponível para que uma série de reações anabólicas ou catabólicas,

ou mesmo ambas, ocorram e produzam o (R)-3-hidroxibutiril coenzima A (3HB-CoA), o qual é o substrato (monômero) para a PHA sintase (também chamada PHA polimerase) (FACCIN, 2012).

Assim a PHA sintase, enzima chave para a síntese de PHAs, catalisa a formação das ligações ésteres com liberação da coenzima A formando o P(3HB). Um dos intermediários na síntese do P(3HB) é a acetil coenzima A (acetil-CoA) que é necessária para a síntese do monômero (R)-3-hidroxibutiril coenzima A (3HB-CoA). Porém, essa molécula é também o composto chave para o metabolismo celular, sendo oxidada através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) também conhecido como ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs. Acetil-CoA, intermediário central no metabolismo de todos os compostos de carbono, pode ser usado para gerar energia biologicamente útil ou utilizado para o crescimento e multiplicação. Desse modo a síntese de P(3HB) concorre em simultâneo com o TCA pela utilização da acetil-CoA. A Figura 9 apresenta a via metabólica do microrganismo para a obtenção do P(3HB) (FACCIN, 2012).



**Figura 10 - Rotas metabólicas conhecidas para suprimento do monômero (R)-3-hidroxi-butilato utilizado na síntese de P(3HB)**



**PhaA –  $\beta$ cetotiolase, PhaB - NADPH-dependente acetoacetyl-CoA redutase, PhaC - PHA sintase, PhaG - 3-hidroxiacil-ACP-CoA transferase, PhaJ - (R)-enoil-CoA hidratase, FabD - malonil-CoA-ACP transacilase, FabG - 3-cetoacil-CoA redutase.**

**Fonte: Faccin (2012).**

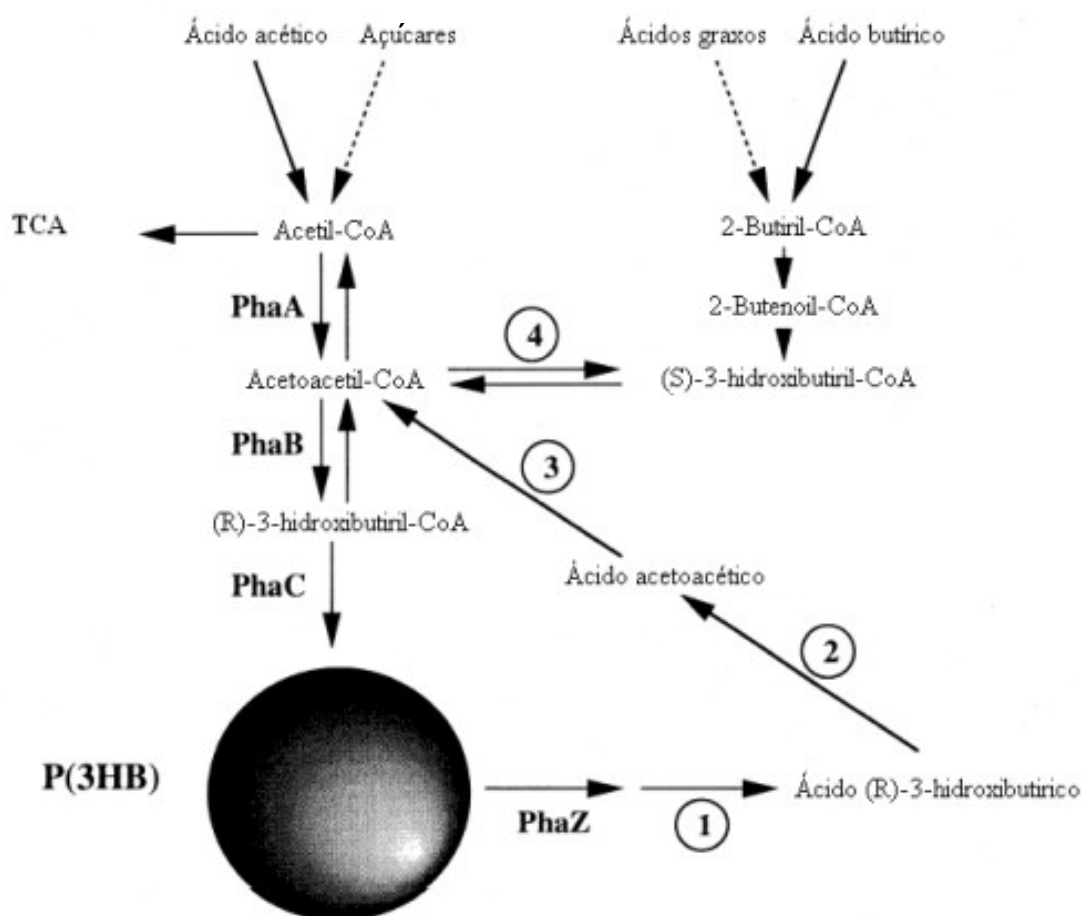
A síntese de P(3HB) é a única, dentre outros compostos acumulados por microrganismos para reserva de energia, que não consome diretamente ATP na síntese. Apesar de não envolver diretamente o cofator  $\text{NAD}^+$  nem ATP nas reações de produção de P(3HB) a partir da Acetil-CoA, sempre é necessário considerar as relações de reciclagem de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  e  $\text{ATP}/\text{ADP}$ , pois a falta de algum destes componentes pode afetar o fluxo de metabólitos (FACCIN, 2012).

O metabolismo do P(3HB) é cíclico (Figura 11), e a relação entre a síntese e degradação do P(3HB) é dada pelas condições de crescimento. Em condições desfavoráveis, em geral baixa oferta de carbono, o P(3HB) é degradado pela ação da

enzima PHA depolimerase (PhaZ) formando ácido 3-hidroxiбутírico que é convertido a ácido acetoacético pela ação da 3-hidroxiбутirato desidrogenase NAD<sup>+</sup> dependente.

Seguindo o ciclo, teremos a formação de acetoacetyl-CoA pela ação da acetoacetyl-CoA sintetase, intermediário comum entre a síntese e degradação do P(3HB). A partir disto, este pode ser usado na síntese de P(3HB) ou convertido à acetyl-CoA pela reação reversível novamente catalisada pela  $\beta$ -cetotilase (Faccin, 2012).

**Figura 11 - Metabolismo cíclico da biossíntese e degradação do P(3HB) em bactérias.**  
Fontes de Carbono



PhaA -  $\beta$ -cetotilase, PhaB - NADPH-dependente acetoacetyl-CoA redutase, PhaC - PHA sintase, PhaZ - PHA depolimerase, 1, dímero hidrolase, 2, (R)-3-hidroxi-butirato desidrogenase, 3, acetoacetyl-CoA sintetase, 4, NADH-dependente acetoacetyl-CoA redutase.

Fonte: Faccin (2012).

### 4.3 Procedimentos experimentais

Realizou-se procedimentos experimentais afim de analisar algumas características físico-químicas da vinhaça de etanol milho e entender como estas

podem influenciar no uso deste efluente como uma fonte de carbono adequada à produção de P(3HB) pelo *B. megaterium*.

#### 4.3.1 Massa específica

As massas medidas e os valores determinados de massa específica estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3 - Densidade da vinhaça de etanol milho**

Nº Amostra (A)	Massa do Béquer (MB) (g)	MB + A (g)	Massa da amostra (g)	$\rho$ calculado (kg/m <sup>3</sup> )
I	32,0493	43,0340	10,9847	1098,47
II	33,5982	44,5318	10,9336	1093,36
III	33,0153	44,3045	11,2892	1128,92
Média	33,0153 $\pm$ 0,7823	44,3045 $\pm$ 0,8071	10,9847 $\pm$ 0,1922	1098,47 $\pm$ 19,23

**Fonte: Autora (2021).**

#### 4.3.2 Potencial hidrogeniônico

Os valores medidos para do potencial hidrogeniônico (pH) da vinhaça estão descritos na Tabela 4.

**Tabela 4 - pH da vinhaça de etanol de milho**

Amostra (A)	pH
I	3,38
II	3,36
III	3,36
Média	3,36 $\pm$ 0,01

**Fonte: Autora (2021).**

#### 4.3.3 Condutividade elétrica

A condutividade da vinhaça, determinada pela média das medidas em triplicata, está descrita na Tabela 5.

**Tabela 5 - Condutividade medida da vinhaça de etanol de milho**

<b>Amostra (A)</b>	<b>Condutividade Elétrica (S/cm)</b>
I	3,80
II	3,83
III	3,81
Média	3,81 ± 0,01

**Fonte: Autora (2021).**

#### 4.3.4 Grau Brix

A medida do grau Brix, determinada pela média de valores em triplicata, encontra-se registrado na Tabela 6.

**Tabela 6 - Grau Brix da vinhaça de etanol de milho**

<b>Amostra (A)</b>	<b>Grau Brix</b>
I	4
II	4
III	4
Média	4

**Fonte: Autora (2021).**

#### 4.3.5 Sólidos totais, fixos e voláteis

Utilizando Equações 2, 3 e 4, tem-se os resultados de sólidos totais, fixos e voláteis que estão expressos na Tabela 7.

**Tabela 7 - Valores de sólidos totais, fixos e voláteis da vinhaça de etanol de milho**

<b>Amostra</b>	<b>Sólidos totais (mg/L)</b>	<b>Sólidos fixos (g/L)</b>	<b>Sólidos voláteis (g/L)</b>
I	34,98	2,97	32,01
II	34,01	2,85	31,16
III	34,09	3,23	30,86
Média	34,36 ± 0,54	3,02 ± 0,19	31,34 ± 0,59

**Fonte: Autora (2021).**

#### 4.3.6 Caracterização físico-química da vinhaça de etanol de milho

Com o resultado das análises anteriores, elaborou-se a Tabela 9, que contém os valores médios das triplicatas de cada metodologia usada na caracterização físico-química da vinhaça de etanol de milho.

**Tabela 8 - Caracterização físico-química da vinhaça de etanol de milho**

<b>Caracterização</b>	<b>Resultado médio</b>
Massa específica	1098,47 ± 19,23 (Kg/m <sup>3</sup> )
pH	3,36 ± 0,01
Condutividade elétrica	3,81 ± 0,01 (S/cm)
Grau Brix	4 ± 0,00 (%)
Sólidos totais	34,36 ± 0,54 (g/L)
Sólidos fixos	3,02 ± 0,19 (g/L)
Sólidos voláteis	31,34 ± 0,59 (g/L)

Fonte: Autora (2021).

## 5 DISCUSSÃO

De acordo com Takahashi (2012), os fatores que geralmente inviabilizam economicamente os biopolímeros de origem microbiológica, são: (i) a sua produtividade; (ii) acúmulo total de PHA nas células; (iii) a tecnologia aplicada; (iv) a planta de produção; (v) o processo de extração/recuperação/purificação e as fontes de substrato e de nutrientes, principalmente o carbono.

O carbono é essencial ao crescimento e manutenção do *B. megaterium* em conjunto com outros micronutrientes. A produção do polímero e seu acúmulo, ocorre pela *B. megaterium* somente quando há excesso de carbono e delimitação de algum outro nutriente essencial como P, Fe, Mg, N e O. As características físico-químicas da vinhaça são favoráveis ao seu uso na como fonte de carbono na produção de P(3HB), pois, através do estudo da via metabólica, considera-se que ocorra a conversão dos açúcares metabolizáveis deste resíduo em biopolímero.

Os procedimentos experimentais da análise da vinhaça, demonstram que ela possui o valor de grau Brix igual a quatro. Durante o processo produção do etanol de milho, discutido no tópico 4.2.4 da revisão bibliográfica, a moagem, o cozimento e a liquefação do milho liberam e convertem o amido de milho presente no mosto em glicose, que é consumida durante o processo de fermentação pela levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). Segundo Lopes *et al.* (2016) essa fermentação degrada de 85 a 90% dos açúcares do mosto e o restante segue para a etapa de destilação, onde uma parte fica contida na vinhaça. Erickson (2012) determinou a concentração de 2,1 g/L de açúcar redutor na forma de glicose sugerindo que possa haver glicose também na amostra analisada neste trabalho. Contudo, tal evidência deve ser ainda confirmada experimentalmente.

O preço da fonte de carbono tem papel crucial na economia do processo. Uma vez que o custo do substrato representa aproximadamente 50 % do custo total de produção, a utilização de resíduos agroindustriais tem como principal objetivo viabilizar economicamente a produção do biopolímero (SCHMIDT, 2019). A fim de serem competitivos com plásticos comuns, os custos de produção dos PHAs devem ser minimizados. Atualmente as matérias-primas utilizadas para a produção de PHAs são substratos de valores elevados, como sacarose, óleos vegetais e ácidos graxos. Por ser um resíduo que demanda destinação adequada, a vinhaça é um substrato relativamente barato de se utilizar. Seu uso em um bioprocessos possui a vantagem

de ser uma alternativa ecologicamente melhor e ainda gerar um produto de maior valor agregado se comparado aos substratos.

O pH da vinhaça medido foi de 3,36. Entretanto, Alves *et al.* (2020) observaram uma maior multiplicação celular e um maior acúmulo de P(3HB) em *B. megaterium* cultivada à um pH 6,5. Já Hassamer (2016), ao utilizar o *B. megaterium* para a produção do mesmo biopolímero, observou que a redução do pH para uma faixa entre 5,0 a 5,5 aumentou consideravelmente a biomassa e a quantidade de P(3HB). Segundo Yatim *et al.* (2017) o *B. megaterium* tolera um pH entre 5 e 9, evidenciando a necessidade de alcalinizar o meio contendo vinhaça.

Segundo Lopes (2013) e Ma (2018) há relação entre o aumento da condutividade elétrica e o teor de nutrientes e sais contidos no meio analisado. A condutividade obtida de 3,81 S/cm é um indicativo de que a vinhaça analisada possui teor nutritivo. Em cultivo de *B. megaterium*, o teste de condutividade elétrica detecta a capacidade de hidrólise da ureia, um indicativo de atividade microbiana (MING *et al.*, 2019). A diferença de valores de condutividade elétrica medida da vinhaça pura e posterior medição durante a fermentação do *B. megaterium* serve como um parâmetro comparativo, para indicar se houve atividade microbiana.

Assim, a vinhaça de etanol de milho se torna uma boa fonte alternativa de carbono. Com o aumento da produção de etanol de milho no Brasil, há também o aumento dessa vinhaça residual. Em consequência dos problemas ambientais causados por esse resíduo, devem-se buscar novas destinações e aplicações vantajosas ambientalmente e que ao mesmo tempo, haja a produção de um material de alto valor de mercado, como é o caso do P(3HB).

Por fim, as bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* possuem características interessantes para aplicações industriais como tolerância a alta temperatura e alta pressão osmótica, além de apresentarem um rápido crescimento celular (HANSSAMER, 2016). Ao fazer uso da vinhaça de etanol de milho como principal substrato, sugere-se que ainda exista glicose disponível nesse meio e que esta possa ser metabolizada pela *B. megaterium* pela via mais conhecida é a que ocorre a partir da metabolização de açúcares, vindo a produzir o PHA.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram possíveis obter algumas características físico-químicas da vinhaça de etanos de milho através dos procedimentos experimentais, o que ajuda a avaliar a possível viabilidade de sua aplicação para a produção de P(3HB).

A revisão da produção de P(3HB) foi possível, entretanto, até nosso conhecimento, a utilização de resíduo da fermentação do etanol de milho como substrato para a *B. megaterium* na produção de P(3HB) não foi reportada na literatura. Assim, buscou-se como base os trabalhos semelhantes, que reportam o uso de outros substratos ou microrganismos com mecanismos semelhantes de produção do biopolímero. Foi possível evidenciar que a vinhaça de etanol de milho é um substrato adequado a esse processo devido às suas características obtidas experimental e bibliograficamente, entretanto, a realização de procedimentos experimentais se faz necessária para avaliar as hipóteses levantadas.

Sintetizar poli-3-hidroxibuturato através de *Bacillus megaterium* utilizando essa fonte residual de carbono se torna uma alternativa interessante, principalmente ambientalmente, uma vez que para se tornar um processo competitivo frente às fontes petroquímicas, é necessário viabilizar o aumento da eficiência no processo produtivo através de novas pesquisas, fazendo com que o preço de produção do PHA diminua gradativamente.

Tendo em vista importância ambiental acerca do processo de reutilização de vinhaça para a produção de um biopolímero, deve-se buscar melhorias e novas aplicações industriais desse processo. A tendência mundial é a diminuição dos polímeros petroquímicos, o que vem de encontro a esta pesquisa, o que reforça a continuidade do estudo sobre o assunto.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, Mariane Igansi. **Produção do bioplástico poli-(3hidroxibutirato) [(P3HB)] por *Bacillus megaterium* CN3 suplementado com lipídeos**. 2016. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.
- ALVES, Mariane Igansi; MACAGNAN, K. L. ; PIECHA, C. R. ; TORRES, M. M. ; RODRIGUES, R. S. ; DIAZ, P. S. ; MOREIRA, A. S. . Efeito do pH e sacarose no acúmulo de P(3HB) por *Bacillus megaterium* CN3 utilizando DCCR 22. **Brazilian Journal of Development** , v. 6, p. 19116, 2020.
- ARAÚJO, Danielle Godinho de. **Produção de Poli [3-hidroxibutirato-co-3-hidroxicaprolato] por *Escherichia coli* recombinante a partir de Glicose e Ácido Propiônico**. 2005. 60 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos., Centro Tecnológico da Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina., Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- ARAÚJO, Geraldo Jose Ferraresi de e OLIVEIRA, Sonia Valle Walter Borges de. **Vinhaça - conceito, desafios e oportunidades: uma revisão bibliográfica**. 14 f. In: XXIII Simpósio de Engenharia De Produção: Gestão de Operações em Serviços e seus Impactos Sociais, 2016 Bauru, SP.
- ARAÚJO, Thaíssa Rodrigues. **Reaproveitamento de glicerol para produção de bioprodutos: biopolímeros**. 2014. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.
- BELLUCO, André Eduardo de Souza e ALCARDE, André Ricardo. Cana e milho: métodos distintos convergem ao etanol. **Revista Visão Agrícola**, Piracicaba, v. 8, p.50-52, Jan a jun. 2018. Semestral.
- BERWANGER, Ana Luiza da Silva. **Produção e caracterização de Biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata***. 2005. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2005.
- BERWING, Karina Hammel. **Produção bacteriana de poli(3-hidroxibutirato) a partir de lactose e soro de leite**. 2016. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias., Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Caxias do Sul, 2016.
- BISSACOT, Ethiane Poerschke. **Comparação de diferentes metodologias para purificação de PHA: uma revisão bibliográfica**. Universidade federal do Rio Grande do Sul. Escola de Engenharia. Departamento de Engenharia Química Porto Alegre, 2018
- BORGES, Caroline Dellinghausen; MOREIRA, Ângela Nunes; MOREIRA, Angelitanda Silveira; PINO, Francisco A. B Del; VENDRUSCOLO, Claire Tondo. Caracterização de biopolímeros produzidos por *Beijerinckia sp.* 7070 em diferentes tempos de

cultivo. **Revista Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. Campinas, 24(3):327-332, jul.-set. 2004 p. 327-333

BORGES, Fernanda. **Avaliação do desempenho de solventes não-halogenados na extração do poli (3- hidroxibutirato) a partir de *Bacillus megaterium***. 2017. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

BORTOLETTO, Aline Marques; ALCARDE, André Ricardo. Dominante nos EUA, etanol de milho é opção, no Brasil, para safra excedente. **Revista Visão Agrícola**, Piracicaba, v. 13, p.135-137, 09 jun. 2015. Semestral.

BRITO, G. Frederico. *et al.* Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 6, n. 2, p.127-139, set. 2011.

CARDOSO, Letícia Oliveira Bispo. **Produção de Polihidroxibutirato (PHB) por Bactérias Metilotróficas**. 2017. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, Departamento de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

CARVALHO, Simone Pereira de; CARRIJO, Ed Licys de Oliveira. **A produção de álcool: do PROÁLCOOL ao contexto atual**. In: XLV Congresso Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2007, Londrina. Anais da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Londrina: SOBER, 2007.

CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Determinação de pH em águas: método eletrométrico**. Norma Técnica L5.145. São Paulo, 1978.

COELHO, Jackson Dantas. **Produção de grãos- feijão, milho e soja. Caderno setorial ETENE**. Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste (ETENE). Nº 33 p.1-12. Ano 3. Fortaleza. jun. 2018

COLTRO, Leda; SARANTÓPOULOS, Claire I.G.L; JESUS J. R, Ildebrando A. **Biopolímeros usados em embalagem: propriedades e aplicações**. In: 8º Congresso Brasileiro de Biopolímeros. Anais do 8º Congresso Brasileiro de Polímeros, Águas de Lindóia - SP, nov. 2005 p. 1301-1303

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira - **Grãos. V. 6 -SAFRA2018/19- N. 4 - Quarto levantamento**. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), Brasília, p. 1-126, jan. 2019

CONAB. **Milho: Análise mensal - Abril/Maio de 2020**. 2020a. Disponível em <<https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-milho>> Acesso em 21/11/2021.

CONAB. **Tabela de Levantamento** - Boletim de Cana-de-Açúcar de 23/04/20. 2020b.

CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA INICIAÇÃO CIENTÍFICA, (COBEQ IC) X, 2013, Vassouras. **Utilização de vinhaça para a produção de**

**poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator***. Vassouras: Blucher Chemical Engineering, 2014. 6 p.

DALCANTON, Francieli. **Produção, extração e caracterização de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* em diferentes substratos**. 2006. 132 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006

DALL'AGNOL, Amélio. **Etanol de milho no Brasil?** Artigo. Radar da tecnologia. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA. P. 1-2, nov. 2017.

DENARI, Gabriela Bueno e CAVALHEIRO, Éder Tadeu Gomes Cavaleiro. **Princípios e aplicações de análise térmica**. Material de Apoio. Instituto De Química de São Carlos. Universidade de são paulo. São Carlos. Jul./ago.2012. IQSC, 2012. 40 p.

DIEGUEZ, Celia M. Tokarski *et al.* Os fundamentos quânticos da Ressonância Magnética Nuclear. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, [s.l.], v. 40, n. 1, p.1-9, 14 ago. 2017.

ERICKSON, Daniel Thomas. **Pilot-scale submersed cultivation of *R. microsporus* var. *oligosporus* in thin stillage, a dry-grind corn-to-ethanol coproduct**. Iowa State University. ProQuest Dissertations Publishing, 2012. 1531478.

ELIA NETO, André. **Estado da Arte da Vinhaça**. União da indústria de cana-de-açúcar- ÚNICA. P. 0- 31. Piracicaba, SP, ago. 2016.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA [EPE]. **Cenários de oferta de etanol e demanda ciclo de otto 2018-2030**. Ministério de Minas e Energia. P. 1-41. Rio de Janeiro: EPE, 2018.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA [EPE]. **Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis - Ano 2020- JULHO DE 2021**. Ministério de Minas e Energia, Brasília-DF, 2021

FACCIN, Débora Jung Luvizetto. **Avaliação de condições de cultivo para aumento da produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* e modelagem do bioprocesso**. 2012. 160 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós- graduação em Engenharia Química, Departamento de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FONSECA, Camila Chuluck da. **Produção e utilização do biopolímero poli(hidroxibutirato) (PHB) em embalagens alimentícias**. 2014. 64f. (TCC) Graduação - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

FORMOLO, Michele Cristina *et al.* Poliidroxicanoatos: Biopoliésteres produzidos a partir de fontes renováveis. **Revista Saúde e Ambiente/ Healt And Envirment Journal**, Joinville, v. 8, n. 2, p.14-21, 9 dez. 2003.

FRANÇA FILHO, Benancil Martins de (Resp. Tec.). **Diagnóstico da Produção de Etanol em Mato Grosso: Binômio Cana-de-açúcar/Milho: Superintendência Regional do Mato Grosso**. Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). 17. ed. Cuiabá, 2018. 16 p. (Compêndio de estudos Conab).

FREITAS, Silene Maria de e MIURA, Maximiliano. **Situação Atual e Perspectivas da Produção Brasileira de Etanol de Milho**. Análises e Indicadores do Agronegócio. Instituto De Economia Agrícola (IEA). v. 13, n. 5. P. 1-5, maio 2018.

FUESS, Lucas Tadeu. **Potencial contaminante e energético da vinhaça: riscos de contaminação ao solo e recursos hídricos e recuperação de energia a partir da digestão anaeróbia**. 2013 161 f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Geociências e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Campus de Rio Claro. Rio Claro, 2013.

FUGITA, Renan Augusto. **Desidratação e retificação de etanol produzido a partir da amêndoa do caroço da manga**. Dissertação: mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade De Ciências – Campus De Bauru. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Materiais. Bauru, 2014.

GRIPPA, Mario José Cacho. **Planta flex no mato grosso**. 2012. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação MBA, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

GUTH, Thomé Luiz Freire. **Milho. Perspectivas Para A Agropecuária: safra 2018/2019**. Companhia Nacional De Abastecimento (CONAB). v. 6, p.1-112, Brasília, out. 2018. Anual.

HASSEMER, Guilherme de Souza. **Produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* Utilizando Permeado de Soro de Leite**. 2016. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

HENRIQUE, Alisson e CHERUBIN, Natália. **Etanol de milho avança no Brasil**. RPA News. Edição 210 (online). Mar. 2020. Disponível em: <  
<https://revistarpanews.com.br/etanol-de-milho-avanca-no-brasil/>>

JESUS, Rodolfo Cardoso de. **Processamento e Caracterização de Biocompósitos de PHB com Fibras Naturais de Coco e Sisal Acetiladas e Não-Acetiladas**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, SP: [s.n.], 2008.

LOPES, M.L.; PAULILLO, S. C.L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A. LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; AMORIM, H.V. **Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry**. Braz J Microbiol.47, 64-76, 2016

LOPES, Cláudio Hartkopf; GABRIEL, Afra Vital Matos Dias; BORGES, Maria Teresa Mendes Ribeiro. **Produção de etanol a partir da cana-de-açúcar: tecnologia de produção de etanol**. São Carlos: Uab-ufscar, 2011. 135 p.

LOPES, Miguel Alfredo Ruiz. **Comportamento químico e microbiológico no biofertilizante tipo supermagro**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013, 52p. Dissertação de Mestrado.

LUVIZETTO, Débora Jung. **Cultivo da bactéria *Bacillus megaterium* para a produção do biopolímero poli(3-hidroxibutirato) e modelagem matemática do Bioprocessos**. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado), Curso de Programa de Pós-

Graduação em Engenharia Química., Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

MA, Hongzhi *et al.* **Effect of fermentation stillage of food waste on bioelectricity production and microbial community structure in microbial fuel cells**. The Royal Society open Science. V. 5, 2018.

MARQUES, Sidnei José Pereira e CUNHA, Magda Elisa Turini da. **Produção de Álcool Combustível Utilizando Milho**. Artigo. UNOPAR Cient. Exatas Tecnol., Londrina, v. 7, p. 45-51, nov. 2008

MEDEIROS, Marília Costa de; LUZ, Edja Lillian Pacheco da; SANTOS Patrícia Nazaré Ferreira dos; FERNANDES, Jeyson Barreto. **Alternativas para destinações adequadas da vinhaça no semiárido nordestino**. In: II CONIDIS-Congresso Internacional da Diversidade Do Seminário. V. 1, 2017

MICHELLON, Ednaldo; SANTOS, Ana Aracelly Lima; RODRIGUES, Juliano Ricardo Alves. **Breve descrição do Proálcool e perspectivas futuras para o etanol produzido no Brasil**. In: XLVI Congresso Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2008, Rio Branco. Anais da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Brasília: SOBER, 2008.

MILLER, G. L. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MING, Sui *et al.* **Experimental Study on Optimization of Culture Medium and Culture Environment of *Bacillus Megaterium***. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. doi:10.1088/1757-899X/612/2/022113. 2019.

MOHAPATRA, Swati *et al.* Comparative analysis of PHAs production by *Bacillus megaterium* OUAT 016 under submerged and solid-state fermentation. Saudi **Journal of Biological Sciences**. 2020. DOI:10.1016/j.sjbs.2020.02.001

MÜLLER, Caroline *et al.* **Resíduos de cana-de-açúcar e milho como matéria-prima do etanol 2g: atualidades e perspectivas**. In: VOIGT, Carmen Lúcia *et al* (Ed.). Impactos das tecnologias na engenharia química. 3ª ed. Ponta Grossa: Atenas, 2019. Cap. 2. p. 8-22

NOVA CANA. **Estados Unidos projetam estagnação na produção de etanol para 2019 e 2020**. 2019. Disponível em: <<https://www.novacana.com/n/etanol/mercado/estados-unidos-estagnacao-producao-etanol-2019-2020-070219>>. Acesso em: 07 fev. 2019.

NOVOZYMES (2002). **Fuel ethanol production: technological and environmental improvements**. Novozymes & BBI International, 2002.

OPENSTAX. **Chemistry**. 2022

PAULO, Heloisa Delgado. Biopolímeros: uma alternativa favorável. **Revista: Temas Atuais em Biologia**. Volume 2, Número 1, 2014. DOI: 10.4322/temasbio.n2.018

PEREIRA, Willian Victor de Souza. **Usina flex de etanol: estudo de viabilidade técnica e econômica do uso do milho na entressafra da cana-de-açúcar**. 2017. 19 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Agrônômica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

QUEIROZ, Fernando Oliveira de; ALVES, Jéssica Oliveira; FERREIRA, Deusmaque Carneiro, SILVA, Marcelo Bacci da. **Processo de reaproveitamento da água da vinhaça**. Enciclopédia Biosfera- Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.14, n.26, p. 1395, 2017.

RAICHER, Gil. **Análise Econômica da Produção de Polímeros Biodegradáveis no contexto de uma Biorefinaria a partir de cana-de-açúcar**. 2011. 178 f. Tese (Doutorado), Curso de Programa de Pós-graduação

RIBEIRO, Sergio Silva. Cultura do milho no Brasil. **Revista Científica Semana Acadêmica**. ano 2014, Nº. 49, Fortaleza. mar. 2014.

ROSENTRATER, Kurt. A. Overview of Corn-Based Fuel Ethanol Coproducts: Production and use. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service U.S.A. In book: **Biofuel's Engineering Process**. Technology. DOI:10.5772/17180. 2014.

ROSSETO, Ricielly Eloyze; MADALENA, Lilian Cristina de Souza; OLIVEIRA, Adriana Ferla de; CHANG, Pablo; PRIMIERI, Bianca Fiori; FRIGO, Elisandro Pires e SANTOS, Reginaldo Ferreira. **Panorama do etanol brasileiro**. In: II Seminário de Engenharia de Energia na Agricultura Acta Iguazu, v. 6, n. 5, p. 13-22, 2017.

SABESP- Companhia de saneamento básico do Estado de São Paulo. Sólidos-método de ensaio. **Norma técnica NTS 013**. São Paulo, 1999.

SANCHUKI, Carlos Eduardo. **Potencial biotecnológico da bactéria marinha *Halomonas hydrothermalis*: produção de bioplástico poli(3-hidroxibutirato) e coprodutos a partir de efluente hortifrutigranjeiro**. Tese (Doutorado). Universidade Federal Do Paraná. Curitiba. 2017

SAPLA, Rudner Brancalhon. **Tratamento físico químico da vinhaça de destilaria de etanol com biopolímero à base de cálcio**. 70 f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

SCHMIDT, Vanessa Kristine de Oliveira. **Produção de [P(3HB)] por *Bacillus megaterium* utilizando como fonte de carbono hidrolisado de casca de arroz e glicerol residual**. (Trabalho de Conclusão de Curso). Universidade Estadual do Rio Grande do Sul. Novo Hamburgo, 2019. 71 f

SILVA, Roseanne Batista Rodrigues da; SERRA, Juan Carlos Valdés. Revisão de biomassas para produção de etanol de segunda geração. **Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal**, v. 14, n. 1, p. 16-25, jan./jun. 2017

SOLOGUREN, Leonardo. Demanda mundial cresce e Brasil tem espaço para expandir produção. **Visão Agrícola**. Piracicaba, v. 13, p. 8-11, 09 jun. 2015. Semestral.

TAKAHASHI, R.Y.U. **Bioprospecção de bactérias marinhas para a produção de polihidroxialcanoatos**. Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale do Itajaí, Departamento de Ciência e Tecnologia Ambiental, Vale do Itajaí, Santa Catarina, Brasil, p.18 e p. 87.

TORRES, Amelia Angélica Ulloa. Envelhecimento físico químico de tubulações de polietileno de alta densidade empregadas em redes de distribuição de derivados de

petróleo. 2006. 180 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciência dos Materiais e Metalurgia, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

UNEM. **União Nacional do Etanol de Milho**. Reunião da Câmara Setorial do Milho - MAPA. Brasília - DF, 2019

UNEM. NOLASCO, G. Brazil Corn Ethanol Production to Jump 86pc: Unem. [Entrevista concedida a Argus]. Site institucional, Notícias, janeiro, 2020.

YATIM, Ain Farhana Mohd *et al.* Bioconversion of novel and renewable agro-industry by-products into a biodegradable poly(3-hydroxybutyrate) by marine *Bacillus megaterium* UMTKB-1 strain. **Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology**. vol. 98(2) C pp. 141-151 C. 2017

YAZDANI, Mahnaz. Isolation and characterization of a novel  $\gamma$ -radiation-resistant bacterium from hot spring in Iran . **Journal of Basic Microbiology**. 2009, 49, 119–127. 2009. DOI 10.1002/jobm.20080017

ZANFONATO, Kellen. **Aproveitamento de subprodutos da indústria de biocombustíveis para produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha***. 2016. 149 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.