



1. Identificação do Projeto

Título do Projeto PIBIC/PAIC

Avaliação da produção de polihidroxialcanoatos a partir de resíduos das indústrias de alimentos.

Orientador

Adolfo José da Mota

Recém-Doutor

Bolsista

Rafael Cintra Oliveira

1. Informações de Acesso ao Documento

1.1 Este documento é confidencial?

SIM NÃO

1.2 Este trabalho ocasionará registro de patente?

SIM NÃO

1.3 Este trabalho pode ser liberado para reprodução?

SIM NÃO

2. Introdução

PHAs (Polihidroxialcanoatos) são polímeros naturais sintetizados e acumulados na forma de inclusões celulares por uma grande quantidade de bactérias, podendo representar cerca de 80% da massa seca da célula. Esses biopolímeros armazenam energia, e ainda são fontes de carbono para o anabolismo microbiano. (Figueiredo *et al.*, 2014; Rodrigues, 2005; Kessler & Withoutt, 2001). Os PHAs são produzidos na presença de fonte de carbono abundante e carência de nutrientes essenciais para o crescimento celular como: nitrogênio, oxigênio, enxofre, fósforo, magnésio entre outros.



UFAM

O Poli 3- hidroxibutirato (PHB) e o Poli 3- hidroxivalerato (PHV) (Bucci, 2003) são os PHAs mais comumente encontrado na natureza. Apresentam características termoplásticas próprias, todavia o biopolímero que tem sido mais intensamente estudado é o co-polímero poli 3-hidroxibutirato-3-hidroxivalerato (PHBV), porque é o que o melhor atende as exigências das indústrias, pois se cristaliza, é flexível e funde-se a uma temperatura mais baixa (Lavorato, 2008).

Estes biopolímeros tem despertado interesse biotecnológico, pois apresentam características físicas, químicas e termoplásticas muito idênticas aos polímeros de natureza petroquímica (ex: polipropileno) (Bucci, 2003) que são largamente utilizados em todos setores das indústrias em geral e que acumulam-se densamente nos lixos urbanos pois apresentam um longo tempo de decomposição. Em contraste, os PHAs são completamente biodegradáveis na presença de micro-organismos, em condições aeróbicas e anaeróbicas (Lavorato, 2008), pois são substratos que as bactérias metabolizam em busca de carbono e energia.

O grande problema para a produção dos PHAs é o alto custo dos substratos necessários para os micro-organismos sintetizá-los. Frente aos custos dos polímeros convencionais de petróleo, a produção de PHAs fica para segundo plano (Lavorato, 2008). Neste contexto busca-se na presente proposta encontrar substratos de baixo custo para produção de PHAs, sendo uma solução o uso de resíduos orgânicos provenientes das indústrias de alimentos, contribuindo assim tanto para diminuir os impactos ambientais produzidos pelos resíduos, quanto por fornecer um produto plástico biodegradável o que também reduzirá os impactos causados pelo acúmulo de plástico petroquímico no ambiente.

3. Justificativa

O mercado dos biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes é ainda incipiente no Brasil, contudo, uma produção em larga escala é esperada no país (Brito, *et al.*, 2011) porque, apesar de recente, o mercado de bioplástico vem merecendo especial atenção de centros de pesquisa, tanto do governo quanto particulares. Certamente esse interesse é motivado pela crescente busca e aceitação da população mundial por “tecnologias verdes”, seja na produção de energia limpa, processos produtivos ecologicamente corretos, extração sustentável dos recursos naturais, entre outros. A



UFAM

produção de plásticos biodegradáveis e ecologicamente corretos vem atraindo bastante atenção porque o consumo de produtos plásticos derivados do petróleo, ou polímeros não biodegradáveis, vem, ao longo dos anos, produzindo grande número de resíduos desse material os quais se acumulam nos aterros, gerando grandes impactos ambientais (Brito, *et al.*, 2011). Os problemas ambientais causados pelos plásticos aliados ao seu alto consumo, principalmente no mercado de embalagens, vêm motivando pesquisadores e empresários do mundo todo a descobrir novos polímeros e processos para atender essa demanda com qualidade.

Há cinco anos, o Helmut Kaiser Consultancy estimava que o mercado mundial de bioplásticos passaria de 181.000 toneladas para 4.535.000 toneladas em 2015. Na América do Norte, Europa e Ásia, a SRI Consulting projetava uma taxa de crescimento anual de 13% de 2009 a 2014. A expansão é uma questão de tempo: os biopolímeros passarão a ter uma representatividade no mercado a partir de 2030. O mercado de bioplásticos global deverá alcançar um faturamento de mais de 2,8 bilhões de dólares em 2018, de acordo com a Ceresana Research, com taxas de crescimento anuais médias de 17,8%. A Europa foi responsável por 48% do mercado em 2010, seguido por América do Norte e Ásia. Entretanto, um forte aumento é previsto para a América do Sul, liderado por grandes adições de capacidade no Brasil (Rodrigues, 2011).

Como a grande problemática de inserir os bioplásticos nas indústrias está no alto custo da matéria-prima, pretendemos encontrar substratos de baixo custo que sejam fonte de carbono para síntese de PHA pelos micro-organismos, em especial a utilização dos resíduos orgânicos ricos em carbono derivados das indústrias de alimentos, o que poderá contribuir para uma melhor relação custo/benefício, favorecendo o crescimento desse mercado, e ainda, beneficiando a política de uso sustentável dos recursos naturais.

4. Objetivos

4.1 Objetivo geral:

Avaliar a produção de polihidroxialcanoatos a partir de substratos de baixo custo obtidos de resíduos ricos em carbono.

4.2 Objetivos específicos:

4.2.1 Formular composições com resíduos orgânicos compatíveis com cultura líquida de bactérias produtoras de PHA.



UFAM

4.2.2 Testar as formulações, triando aquelas em potencial para ser um bom substrato de baixo custo para a produção de PHA.

4.3.3 Propor um meio de cultura que atenda a demanda custo/benefício para a produção de biopolímeros.

5. Metodologia

5.1 Bactérias para Testes de Cultivo.

O presente projeto é parte integrante de outros projetos desenvolvidos no laboratório. Assim, as bactérias utilizadas no presente trabalho fazem parte da coleção do laboratório, já coletadas e isoladas de diferentes microambientes do Rio Negro. Estas bactérias foram todas testadas quanto a capacidade de acumular PHA através do teste em placa com Vermelho do Nilo (Spiekerman, 1999) e os positivos para o acúmulo foram inseridos no presente trabalho.

Foram utilizados 5 bactérias: MM1.2.10⁻⁸, 2SAT1bLB, 7RP1T3LB, MagLB e 1423. MM1.2.10⁻⁸ e 2SAT1bLB são cepas isoladas do Rio Negro que foram positivas para o acúmulo de PHA de acordo com o teste em placa com Vermelho do Nilo. 7RP1T3LB e MagLB são bactérias também isoladas do Rio Negro, mas foram usadas como controle negativo para os testes, pois não acumularam PHA no ensaio com Vermelho do Nilo. E 1423 é uma cepa padrão de *Ralstonia eutropha* obtida do Laboratório de Microbiologia da USP que é capaz de acumular PHA em até 80% da sua massa seca (Rodrigues, 2005). Todas elas foram caracterizadas quanto à sua micromorfologia (Coloração de Gram).

5.2 Meio Definido para a Produção de PHA - TGP

O meio padrão utilizado nos testes chama-se TGP (Tris, Glicose, Fosfato). Consiste de um meio mínimo que possui minerais essenciais para crescimento microbiano em concentrações baixas: 4,67g/L de NaCl; 1,49g/L de KCl; 1,32g/L de NH₄Cl; 14,53g/L de Tris; 0,54g/L de KH₂PO₄; 17g/L de Ágar; 0,199g/L de MgCl₂; 0,28g/L de Na₂SO₄; 0,022g/L de CaCl₂; 20 g/L de Dextrose, 0,6 mL de FeCl₂ 1M; 1 mL de Zn₂SO₄ 1M; 1 mL de Elemento Traço [0,22 g/L CoCl₂·6H₂O, 9,70 g/L FeCl₃, 7,80 g/L CaCl₂, 0,12 g/L NiCl₂·6H₂O, 0,11 g/L CrCl₃·6H₂O, e 0,16 g/L CuSO₄·5H₂O (Numata & Doi, 2012)]. Em nossos ensaios suplementamos o TGP com 0,5 µg/L do corante Vermelho do Nilo; ele será o indicador para



UFAM

o acúmulo de PHA quando a solução líquida ou sólida apresentar brilho rosa/lilás na presença de luz UV. A eficiência do acúmulo de PHA se dá pela intensidade do brilho; quanto maior for o brilho, por convenção maior foi a capacidade do microrganismo em produzir o biopolímero (Spiekerman, 1999).

5.3 Meio com Resíduo Bruto

Trabalhou-se com 5 resíduos (Abacaxi, Guaraná, Maracujá, Andiroba e Sacha) provenientes de empresas locais de Manaus-AM. Inicialmente formulou-se um meio de cultura sólido com três concentrações de resíduo (10, 7,5 e 5%), contendo água destilada, 17g/L de ágar e 0,5 µg/L de Vermelho do Nilo. Após o preparo, o meio foi ajustado a um pH próximo de 7, e esterilizado a 121° C por 15 min em autoclave. As bactérias foram semeadas e as placas foram incubadas em estufa a 30° C durante 72h. O teste foi realizado em triplicata e avaliado o acúmulo de PHA com auxílio de transluminador UV(λ 354 nM). As bactérias teste foram inoculadas também no Meio Padrão TGP como controle positivo.

5.4 Meio com Extrato do Resíduo

Apenas os resíduos com resultados positivos para acúmulo de PHA através do ensaio anterior (item 5.3) foram utilizados nesse teste. Objetivou-se extrair os açúcares dos resíduos realizando uma liquidificação com 250 ml de água destilada com 25g, 15g e 10g dos resíduos com posterior filtração com toucas do tipo turbante. O tempo de extração foi de 20s e foi calculado o rendimento dos extratos. Após obtidos os extratos, foi adicionado 17g/L de ágar, 0,5 µg/L de Vermelho do Nilo e em seguida ajustado cada meio a um pH próximo de 7. As etapas de inóculo e detecção são idênticas às descritas no item 5.3.

5.5 Análise centesimal dos resíduos

Os resíduos com melhores desempenhos no teste anterior foram selecionados para este ensaio. Foi realizada a determinação de umidade, cinza, proteínas, lipídeos e carboidratos totais.

6. Resultados

6.1 Bactérias teste

As bactérias selecionadas para este trabalho foram caracterizadas quanto a sua micromorfologia. As cepas MM1.2.10⁻⁸ e 2SA1T1bLB isoladas de microambientes do Rio Negro são positivas para o acúmulo de PHA e são respectivamente Coco Gram-positivos e Diplococo Gram-positivos (Figura 1).

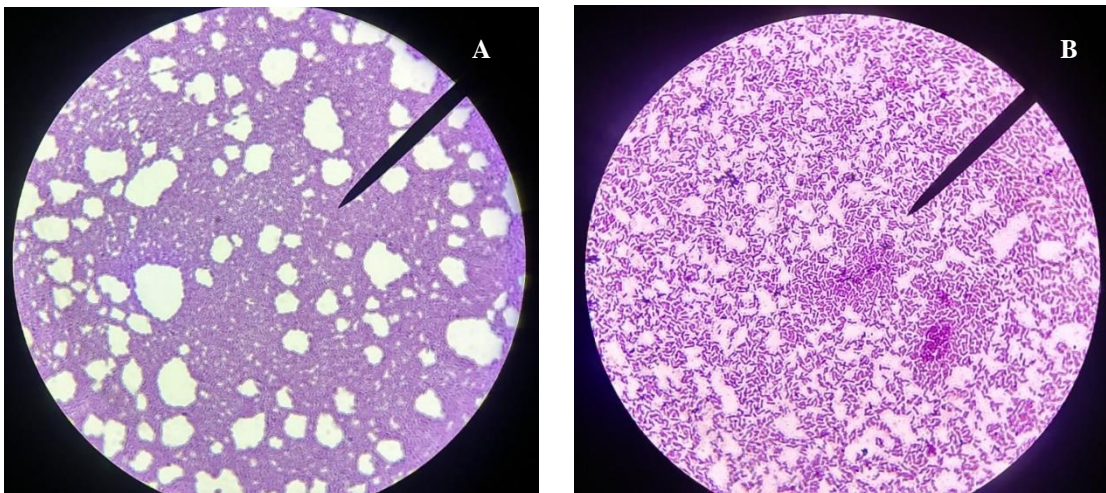


Figura1: Microscopia ótica das bactérias usadas nos ensaios (Objetiva de 100x). **A:** Bactéria MM1.2.10⁻⁸. Coco Gram-positivo isolada do rio negro. Cada pontinho violeta é uma unidade celular do micro-organismo. **B:** Bactéria 2SAT1bLB. Diplococo Gram-positivo.

As cepas 7RP1T3LB e Mag LB foram as bactérias utilizadas como controle negativo para os ensaios, pois não acumularam PHA no teste do vermelho do Nilo. Elas são respectivamente Bacilo Gram-Negativo e Bacilo Gram-Positivo (Figura 2).

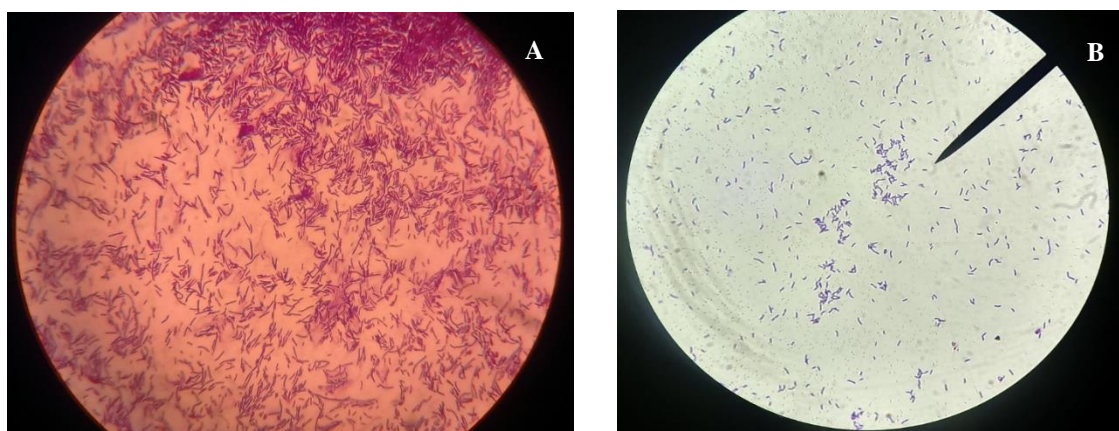


Figura2: Microscopia ótica das bactérias usadas nos ensaios (Objetiva de 100x). **A:** Bactéria 7RP1T3LB. Bacilo Gram-Negativo. **B:** Bactéria Mag LB. Bacilo Gram-Positivo.

A cepa 1423 (Figura 5) é a bactéria padrão positiva para o acúmulo de PHA *Ralstonia eutropha*. A mesma é um Bacilo anaeróbico facultativo quimiolitotrófico Gram-Negativo (Madingan et. al. 2010).

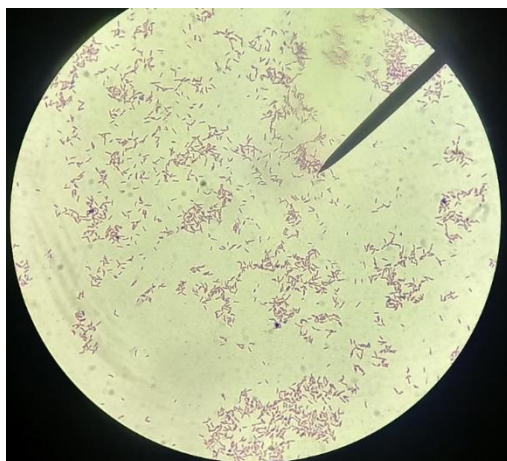


Figura3: Bactéria 1423, *Ralstonia eutropha*. Bacilo Gram-negativo. Objetiva 100x

6.2 Meios de cultura com resíduo

Trabalhou-se com 5 resíduos diferentes (Abacaxi, Maracujá, Sacha, Guaraná e Andiroba). O resultado do teste em placa com vermelho do Nilo encontra-se no Quadro 1.

Quadro 1: Teste de acúmulo de PHA com 5 resíduos orgânicos através do ensaio em placa com Vermelho do Nilo.

	Abacaxi			Maracujá			Sacha			Guaraná			Andiroba			TGP
	10%	7,5%	5%	10%	7,5%	5%	10%	7,5%	5%	10%	7,5%	5%	10%	7,5%	5%	
MM1.2.10 ⁻⁸	++	++	+++	+	+	+	-	-	-	AC	AC	AC	X	X	X	++
2SA1T1b LB	++	++	+++	+	+	+	-	-	-	AC	AC	AC	X	X	X	++
Mag LB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AC	AC	AC	X	X	X	-
7RP1T3LB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	AC	AC	AC	X	X	X	-
1423	++	++	++	+	+	+	-	-	-	AC	AC	AC	X	X	X	++

Brilho intenso (+++), Brilho moderado (++) , Brilho discreto (+), Não houve brilho (-), Apenas crescimento (AC), Ausência de crescimento microbiano (X).

Os resultados mostraram que Abacaxi (*Ananas comosus*) e Maracujá (*Passiflora edulis*) foram os resíduos que se associaram com sucesso ao metabolismo das bactérias para produção de PHA. No tratamento de 5% no resíduo de abacaxi o brilho foi mais intenso



UFAM

que nas concentrações maiores. Não é objetivo desse projeto analisar fatores inibidores, mas considerando o emprego de resíduos brutos é possível supor a existências de fatores inibidores que quando em concentrações maiores são capazes de inibir parte da via, muito provavelmente por nutrir as bactérias de tal forma a tornar inócua a condição necessária para a produção e acúmulo do biopolímero: escassez de determinado nutriente. Esses resultados incentivaram a extração dos açúcares com posterior filtração.

Em Abacaxi observou-se que a cepa padrão *Ralstonia eutropha* não foi tão eficiente na produção em relação as bactérias selvagens do Rio Negro. Além disso o meio de cultura de Abacaxi foi mais eficiente que o Meio de cultura padrão TGP. Esse resultado pode ser explicado pelas origens diferentes de cada cepa. *R. eutropha* foi isolada inicialmente do ambiente marinho, se adapta bem ao meio rico em sais. Entretanto, essa não é a condição encontrada no meio proposto, que se aproxima mais das condições do Rio Negro, rio que acumula em suas águas produtos da decomposição vegetal.

Para sachá (*Plukenetia volubilis*), uma possível explicação seria a grande quantidade de óleo encontrada em seu resíduo. O óleo é um fator que dificulta a composição do meio, não se mistura de forma adequada com os outros componentes e cria uma película hidrofóbica na superfície das placas, dificultando a oxigenação. Ainda, óleo é uma forma de carbono mais complexa que os açúcares. Produção de PHA a partir de óleo não é comumente relatada pela literatura.

Cirqueira (2010) verificou que o extrato de guaraná inibiu o crescimento de *Bacillus sp.* e *Aspergillus niger*. É possível que o resíduo de guaraná (*Paullinia cupana*) possua compostos antimicrobianos em sua composição que não favoreça o crescimento bacteriano, como verificado no ensaio.

Pizzuti, *et al.* (2012) e Brito, *et al.* (2013) observaram o potencial antimicrobiano do óleo de andiroba. Silva e Almeida (2014) testaram o extrato bruto etanólico de andiroba frente a *Klebsiella pneumoniae*, e ela mostrou sensibilidade ao extrato na concentração de 100mg/ml. O meio de cultura com resíduo de andiroba (*Carapa guianensis*) não apresentou crescimento microbiano na placa devido a moléculas do metabolismo secundário do vegetal serem responsáveis por atividades antibacterianas.

6.3 Meio com extrato dos resíduos

Como citado anteriormente os resíduos com melhor desempenho foram selecionados para os próximos ensaios. Os resultados dos rendimentos dos extratos para abacaxi e maracujá são apresentados no Quadro 2. A quantidade de massa utilizado para o maracujá foi reduzido devido a solução originalmente com massas de 25g, 15g, e 10g ter ficado muito viscosa e densa, pois o resíduo de maracujá é altamente higroscópico.

Quadro 2: Rendimento dos extratos de Abacaxi e Maracujá

	Abacaxi			Maracujá		
	25g	15g	5g	7,5g	5g	2,5g
250 mL	72,7%*	77,2%	95,1%	73,4%	82,7%	89,5%

*% representa o quanto da massa original foi recuperada depois da filtração

Os ensaios com os meios de cultura obtidos a partir dos extratos são mostrados na Quadro 3.

Quadro 3: Resultado do teste em placa com Vermelho do Nilo com os extratos de resíduos

	Abacaxi			Maracujá			TGP
	25g	15g	5g	7,5g	5g	2,5g	
MM1.2.10 ⁸	+	++	+++	-	-	+	++
2SA1T1b LB	+	+	+++	-	-	+	++
Mag LB	-	-	-	-	-	-	-
7RP1T3LB	-	-	-	-	-	-	-
1423	+	+	+++	+	+	+	++

Brilho intenso (+++), Brilho moderado (++), Brilho discreto (+), Não houve brilho (-).

Novamente os resultados mostraram a eficiência do acúmulo de PHA usando o resíduo de abacaxi como fonte de carbono. Quando a massa usada do resíduo foi a menor para este ensaio, o brilho em transiluminador foi mais intenso que as outras massas. Segundo Rodrigues (2005) a partir de estudos cinéticos para o crescimento de *Ralstonia eutropha* e acúmulo de PHA verificou-se que para a produção de PHA ser eficiente a concentração de carbono deve ser mantida em uma quantidade ótima. Os tratamentos de 25 e 15g talvez não ofereçam condições para o acúmulo mais eficiente do biopolímero. A figura 6 apresenta uma placa com meio sólido de extrato de abacaxi com massa de 10g.



Tal concentração ótima ainda precisa ser estabelecida, pois é preciso levar em consideração que o processo de resulta na concentração de determinados nutrientes, voltando ao ponto da possibilidade de inibição da via por abundância de nutrientes.

Suwannasing, *et. al.* (2015) realizou o teste com o resíduo de abacaxi para produção de PHA com *Bacillus* sp. formulando meio de cultura com 1,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,8 g de Na_2HPO_4 , 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1 mL de elemento traço e uma concentração de 30 g/L do suco de resíduo do abacaxi. Ele constatou bom crescimento da bactéria no meio e produção de PHA (PHB: poli-3-hidroxibutirato).

6.4 Determinação da Análise Centesimal

O Quadro 4 resume os resultados dos macronutrientes determinados na análise centesimal do resíduo de abacaxi.

Quadro 4: Análise centesimal do Resíduo de Abacaxi.

Parâmetros	Composição (%)	CV (%)
Umidade	9,08 ± 0,49	5,44%
Proteínas	8,67 ± 0,28	8,67%
Cinzas	*	*
Carboidratos	~80	
Lipídios	*	*

(*) Não determinado

Apesar de existir composições não determinadas, por diferença e aproximação na literatura (Lima *et. al.*, 2006; Bortollato & Lora, 2009) pode-se inferir um valor de carboidratos de aproximadamente 80%. Possivelmente o resíduo de abacaxi mostrou mais eficácia na produção de PHA devido ao seu alto teor de carbono presente na composição de carboidratos, principalmente de Sacarose, Glicose e Frutose (Araújo, 2014).

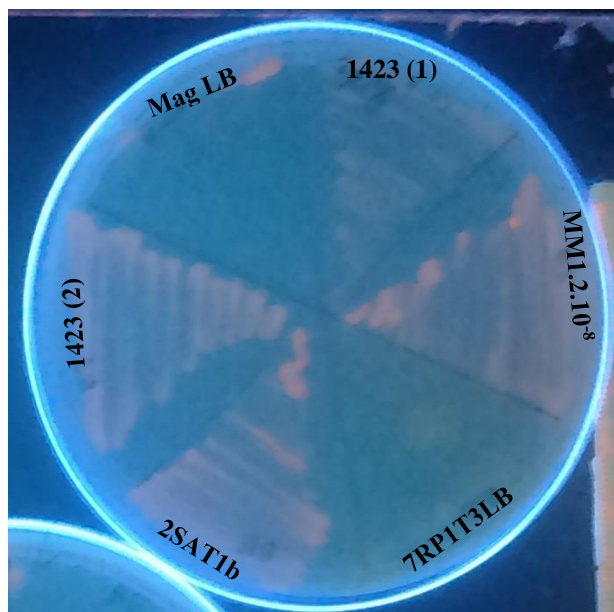


Figura 6: Placa de 10 g de resíduo de abacaxi em 250 ml de meio. As bactérias 1423(1) e 1423(2) são cepas diferentes da mesma espécie. Mag LB e 7RP1T3LB são as bactérias de controle negativo.

7. Conclusão

Os testes revelaram que o resíduo de abacaxi e maracujá foram resíduos agroindustriais potenciais na substituição de fonte de carbono para produção de PHA, sobretudo o resíduo de abacaxi. Para que esse produto ainda sem valor agregado possa ser de fato utilizado pelas indústrias de bioplástico é necessário realizar mais estudos sobre a cinética de produção, a caracterização do polímero produzido e verificar condições de suplementação que ofereçam melhores condições de acúmulo de polihidroxialcanoatos.



8. Referências

AOAC INTERNATIONAL. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 16th edition, AOAC International. Gaithersburg, 2005.

APHA, American Public Health Association, VANDERZANT, C.& SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods**. 3 ed. Washington, DC:,2002.

ARAUJO, William Oliveira, Danilo Martins dos Santos, and Diego Palmiro Ramirez Ascheri. **"OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES DA POLPA DO BARU."** *Revista Agrotecnologia*4.2 (2014): 118-133.

BORTOLATTO, Juliana. **"Avaliação da composição centesimal do abacaxi (*Ananas comosus* (L.) merrill) liofilizado e in natura."** *Revista de Pesquisa e Extensão em Saúde* 4.1 (2009).

BRITO, G. F., Agrawal, P., Araújo, E. M., Mélo, T. J. A. **Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes**. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.6.2 (2011) 127-139

BUCCI, Doris Zwicker *et al.* **Avaliação de embalagens de PHB (poli (ácido 3-hidroxibutírico)) para alimentos**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção. Universidade Federal de Santa Catarina.2003

CIRQUEIRA, M. **Agentes antimicrobianos químicos e naturais**. *Food Ingredients Brasil*São, p. 36-42, 2010.

DA SILVA, Felipe Ramon Parente *et al.* **Análise fitoquímica e microbiológica da atividade do extrato bruto etanólico da Andiroba, *Carapa guianensis*** *Aubl.Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)*, v. 4, n. 4, p. 10-14, 2014.

FIGUEIREDO A, Tamiris VB *et al.* **Produção e caracterização de polihidroxialcanoatos obtidos por fermentação da glicerina bruta residual do biodiesel**. *Quim. Nova*, v. 37, n. 7, p. 1111-1117, 2014.

KESSLER, Birgit; WITHOLT, Bernard. **Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism**. *Journal of biotechnology*, v. 86, n. 2, p. 97-104, 2001.

LAVORATO, Gilka Cunha. **Prospecção de microrganismos produtores de polihidroxialcanoatos (PHAs) com ênfase em *Chromobacterium violaceum*, isolados do Parque Nacional da Serra do Cipó (MG)**. Universidade Federal de Minas Gerais. 2008

LIMA, P.C.C.; SOUZA, B.S.; CARVALHO, A. R.; CARDOSO, P.F. **Composição centesimal das partes do abacaxi**. IFSULDEMINAS. APQ-00926-09. 2006



MADIGAN, Michael T. et al. **Microbiologia de Brock**. [Brock: biology of microorganisms, 12th ed. (inglês)]. Tradução de Andrea Queiroz Maranhão, Beatriz Dolabela de Lima e Cynthia Maria Kyaw, Revisão técnica de Cynthia Maria Kyaw. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. xxxii, 1128 p. Inclui índice; il. color. tab. quad.; 28x21x4cm. ISBN 9788536320939. Palavras-chave: MICROBIOLOGIA; BIOLOGIA. CDU 579.2 / M182 / 12 ed. / 2010

NUMATA, Keiji; DOI, Yoshiharu. **Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates by a novel facultatively anaerobic *Vibrio* sp. under marine conditions**. Marine biotechnology, v. 14, n. 3, p. 323-331, 2012.

PIZZUTI, Kauna; ACOSTA, Lauren Kurz; ALVES, Camilla Filippi Dos Santos. **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS FRENTE A ISOLADOS MULTIRESISTENTES DE INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO**. UNIFRA. Santa Maria – RS. 2012.

RODRIGUES, P. **Bioplásticos** – Os plásticos do futuro – Apesar da oferta e do preço, o crescimento dos bioplásticos é uma realidade impulsionada pela preocupação com o meio ambiente e a substituição de produtos fósseis não só em embalagens descartáveis, mas em bens cada vez mais duráveis. 2011.

RODRIGUES, Rafael Costa. **Condições de cultura para a produção de poli (3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* a partir de resíduos de indústrias de alimentos**. Pós-graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. 2005

SPIEKERMANN, P., Rehm, B. H., Kalscheuer, R., Baumeister, D., & Steinbüchel, A. (1999). **A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds**. *Archives of microbiology*, 171(2), 73-80.

SUWANNASING, Waranya; IMAI, Tsuyoshi; KAEWKANNETRA, Pakawadee. **Potential Utilization of Pineapple Waste Streams for Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Production via Batch Fermentation**. Journal of Water and Environment Technology, v. 13, n. 5, p. 335-347, 2015.

