



**COPPE/UFRJ**

## PRODUÇÃO DE POLI(HIDROXIALCANOATOS) A PARTIR DE GLICEROL

Dirceu Pereira dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador(es): Tito Lívio Moitinho Alves

José Carlos Costa da Silva Pinto

Rio de Janeiro

Maio de 2009

PRODUÇÃO DE POLI(HIDROXIALCANOATOS) A PARTIR DE GLICEROL

Dirceu Pereira dos Santos

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Aprovada por:

---

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D. Sc.

---

Prof. José Carlos Costa da Silva Pinto, D. Sc..

---

Prof. Helen Conceição Ferraz, D. Sc.

---

Prof. Marcio Nele de Souza, D. Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MAIO DE 2009

Santos, Dirceu Pereira

Produção de Poli(hidroxialcanoatos) a partir de Glicerol / Dirceu Pereira dos Santos. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2009.

XIII, 94 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Tito Lívio Moitinho Alves

José Carlos da Costa Pinto

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2009.

Referencias Bibliográficas: p. 80-89.

1. Poli(hidroxialcanoato). 2. Glicerol. 3. Microorganismo. I. Alves, Tito Lívio Moitinho *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus orientadores, professores Tito e José Carlos, pelos ensinamentos e pela atenção.

Ao Programa de Engenharia Química da COPPE, por me acolher como aluno e me formar como um mestre.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa que permitiu minha estada no Rio de Janeiro.

Aos colegas do Laboratório de Bioprocessos e LMSP pela troca de experiência, e pela amizade.

Aos colegas dos laboratórios; LabPol, LEC, Nucat e PAM.

Ao senhor Eduardo do IMA, Grazielle e Beth pelas análises fornecidas e os ensinamentos.

Ao meu pai, minha mãe e minhas irmãs por estar ao meu lado.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

## PRODUÇÃO DE POLI(HIDROXIALCANOATOS) A PARTIR DE GLICEROL

Dirceu Pereira dos Santos

Maio/2009

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves

José Carlos da Costa Silva Pinto

Programa: Engenharia Química

Neste trabalho foi desenvolvido um processo para a produção bacteriana de poli(3-hidroxiбутирато), P(3HB), utilizando glicerol puro ou glicerina produzida nas plantas de biodiesel como única fonte de carbono. O alto custo de produção dos poli(hidroxicanoatos) (PHAs) exige que estratégias alternativas de operação sejam adotadas para que os processos de produção sejam otimizados. No presente trabalho algumas estratégias como variação da razão molar carbono/nitrogênio no meio de cultura, alimentação de glicerol em cultivo semi-contínuo e aeração, foram estudadas. Na melhor condição de reação obteve-se concentração celular de  $8 \text{ g.L}^{-1}$  e teor de biopolímero de 30%. Além disso, os resultados experimentais indicam que o oxigênio dissolvido pode estar limitando o crescimento celular. O PHA produzido foi quantificado por cromatografia gasosa após reação de propanólise. Foi observado que *Bacillus sp.* nas condições aqui estudadas foi capaz de produzir PHA tanto em cultivo com glicerol P.A quanto em glicerina tratada. O biopolímero extraído das células e precipitado em etanol foi caracterizado por calorimetria diferencial de varredura e ressonância magnética nuclear, tendo apresentado propriedades praticamente idênticas às do P(3HB) comercial. O rendimento do glicerol em P(3HB) foi equivalente a 30% da massa celular seca.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

## PRODUCTION OF POLY(HYDROXYALKANOATES) USING GLYCEROL

Dirceu Pereira dos Santos

May/2009

Advisors: Tito Lívio Moitinho Alves

José Carlos da Costa Silva Pinto

Department: Chemical Engineering

A process was developed for production of bacterial poly(3-hydroxybutirate), P(3HB), using pure glycerol and glycerin from biodiesel plants as the single sources of carbon. The high production costs of polyhydroxyalkanoates (PHA) require the implementation of alternative operation strategies for process optimizations. The strategies used to increase the cell concentration, and consequently the P(3HB) productivity, were based on manipulation of the carbon/nitrogen ratio, the glycerol concentrations and the degree of aeration. At the best conditions, the cell concentrations reached  $8 \text{ g.L}^{-1}$ . The biopolymer content was around 30% (in dry weight) in all experiments. Moreover, the experiments indicate that the rate of cellular growth is limited by the amount of dissolved oxygen. PHA samples were characterized through gas chromatography (after propanolysis), differential scanning calorimetry and nuclear magnetic resonance, which showed that the bacteria *Bacillus sp.* is able to produce PHA from glycerol and treated glycerin with properties that are similar to the properties of commercial P(3HB).

## ÍNDICE

<b>Capítulo 1</b> .....	<b>1</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>1</b>
1 Objetivos da dissertação .....	4
2 Estrutura da dissertação .....	4
<b>Capítulo 2</b> .....	<b>6</b>
<b>Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>6</b>
2.1 Polímeros da classe dos poli(hidroxicanoatos).....	6
2.2 História evolutiva do estudo do poli(3-hidroxi-butirato) e os (PHA).....	8
2.3 Microrganismos produtores de poli(hidroxicanoatos).....	9
2.4 Biossíntese de PHAs.....	12
2.6 Produção de Poli(hidroxicanoatos).....	13
2.6.1 Produção de PHA <i>in vitro</i> .....	14
2.6.2 Produção de PHA <i>in vivo</i> .....	14
2.8 Extração dos poli(hidroxicanoatos) .....	15
2.7 Determinação de Poli(hidroxicanoato) .....	16
2.9 As propriedades dos poli(hidroxicanoatos) .....	17
2.10 Aplicação dos poli(hidroxicanoatos) .....	21
2.11 Biodegradação dos poli(hidroxicanoatos) .....	22
2.12 Dificuldades encontradas na produção de poli(hidroxicanoatos).....	25
2.13 Fontes alternativas de carbono .....	26
2.13.1 Glicerol .....	28
2.14 Comentários Finais .....	30
<b>Capítulo 3</b> .....	<b>31</b>
<b>Materiais e Métodos</b> .....	<b>31</b>
3.1 Materiais e metodologia .....	31
3.1.1 Reagentes.....	31
3.1.2 Microorganismo .....	31
3.2 Meios de cultura .....	31
3.2.1 Meio para reativação celular e armazenamento do microorganismo .....	32
3.3 Preparação do pré-inóculo .....	33
3.4 Cultivo Celular em frascos agitados utilizando glicerol.....	33

3.5 Cultivo em Biorreator .....	34
3.6 Efeito da concentração de glicerol .....	35
3.7 Avaliação da concentração de glicerol e nitrogênio .....	36
3.8 Cultivo celular em frascos agitados utilizando sacarose .....	36
3.9 Aeração .....	36
3.10 Curva de calibração do etanol .....	37
3.11 Gravimetria para a determinação de massa seca de células .....	38
3.12 Calibração espectrofotométrica de massa celular .....	38
3.13 Curva de calibração para o glicerol .....	40
3.14 Estudo do Processo de fermentação utilizando glicerina. ....	42
3.15 Determinação de Poli-hidroxi-butirato .....	43
3.16 Curva de calibração para o nitrogênio .....	45
3.17 Extração do Poli(hidroxi-álcanoato) .....	45
3.18 Métodos utilizados para a caracterização do biopolímero produzido .....	46
3.18.1 Análise de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) .....	47
3.18.2 Comportamento térmico .....	47
3.18.2.1 Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) .....	47
3.19 Microscopia eletrônica do microorganismo estudado .....	48
3.20 Identificação da bactéria .....	49
<b>Capítulo 4 .....</b>	<b>50</b>
<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>50</b>
4.1 Cinética de crescimento em frasco agitado .....	50
4.2 Perfis dinâmicos de concentração de células para diferentes concentrações iniciais de glicerol .....	51
4.3 Avaliação do efeito da concentração de glicerol e nitrogênio sobre o crescimento. ....	52
4.4 Cultivo celular em frascos agitados utilizando sacarose .....	56
4.5 Efeito do fator aeração sobre o crescimento do microorganismo .....	57
4.7 Consumo de substrato pelo microorganismo .....	59
4.8 Estudo sobre o pH do meio de cultivo .....	59
4.9 Estudo do Processo de fermentação utilizando glicerina. ....	59
4.10 Determinação de poli(3-hidroxi-butirato) .....	61
4.11 Cultivos em biorreator .....	62
4.11.2 Cultivos em biorreator em batelada alimentada .....	64

4.11.2.1 Efeito da relação C/N igual a 7,28 no cultivo em biorreator em batelada alimentada.....	64
4.11.2.2 Efeito da relação C/N igual a 5,0 no cultivo em biorreator em batelada alimentada.....	66
4.11.2.3 Efeito da relação C/N igual a 2,5 no cultivo em biorreator em batelada alimentada.....	67
4.11.2.4 Efeito da relação C/N igual a 2,5 no cultivo em biorreator em batelada alimentada.....	68
4.11.2.5 Efeito da relação C/N igual a 1,6 no cultivo em biorreator em batelada alimentada.....	70
4.11.2.6 Efeito da relação C/N igual a 1,6 no cultivo em biorreator em batelada alimentada.....	71
4.12 Extração do Poli(3-hidroxiacanoato).....	73
4.13 Comportamento térmico .....	73
4.13.1 Análise Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) .....	73
4.14 Discussão das análises de ressonância magnética nuclear (RMN).....	75
4.14 Discussão sobre os resultados de microscopia eletrônica .....	75
4.15 Discussão sobre a identificação de bactérias .....	76
<b>Capítulo 5 .....</b>	<b>78</b>
<b>Conclusões e sugestões .....</b>	<b>78</b>
5.1 Conclusões.....	78
5.2 Sugestões .....	79
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>80</b>
<b>Apêndice .....</b>	<b>90</b>
1.0 Apêndice.....	90
2.0 Apêndice.....	92

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1:</b> Esquema simplificado da biossíntese dos PHAs adaptado (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995).....	12
<b>Figura 2.2:</b> Estrutura química do PHA. Todos os monômeros têm um centro quiral (*), n pode variar de 100 – 30000 monômeros e R indica um radical alquila. ....	20
<b>Figura 2.3:</b> Representação genérica dos PHAs. ....	21
<b>Figura 2.4:</b> Esquema gráfico da biodegradação de PHA, em leito aerado adaptado (SUDESH <i>et al.</i> , 2006). ....	23
<b>Figura 2.5:</b> Mecanismo de degradação de bioplásticos, adaptado de SUDESH <i>et al.</i> , 2006. ....	24
<b>Figura 2.6:</b> Reação de transesterificação para a produção do biodiesel adaptado (SILVA <i>et al.</i> , 2009). ....	29
<b>Figura 3.1:</b> Curva de calibração para o etanol por cromatografia gasosa. ....	37
<b>Figura 3.2:</b> Curva de correlação entre a concentração celular de <i>Bacillus sp.</i> e a absorvância do meio em 600 nm. ....	39
<b>Figura 3.3:</b> Correlação linear entre a concentração celular e a absorvância do meio. ...	40
<b>Figura 3.4:</b> Curva de calibração para o glicerol por espectrofotometria com comprimento de onda de 505 nm. ....	41
<b>Figura 3.5:</b> Equação da curva de calibração para o glicerol por espectrofotometria com comprimento de onda de 505 nm na região linear.....	42
<b>Figura 3.6:</b> Curva de calibração para o PHB por cromatografia gasosa. ....	44
<b>Figura 3.7:</b> Curva de calibração para análise do nitrogênio por espectrofotometria com comprimento de onda de 625 nm. ....	46
<b>Figura 4.1:</b> Curva de crescimento característico de <i>Bacillus sp.</i> , em meio mínimo com concentração inicial de glicerol de 20 g/L mantido a 170 rpm e 30 °C.....	51
<b>Figura 4.2:</b> Influência da concentração de glicerol sobre o crescimento de <i>Bacillus sp.</i> realizada sobre as condições de 170 rpm e 30 °C.....	51
<b>Figura 4.3:</b> Efeito de nitrogênio e glicerol sob o crescimento do microorganismo. Os cultivos representados por letras iguais têm a mesma concentração de sulfato de amônio. ....	53
<b>Figura 4.4:</b> Efeito de nitrogênio e glicerol sobre o crescimento do microorganismo. Os cultivos representados por letras iguais têm a mesma concentração de sulfato de amônio. ....	54

<b>Figura 4.5:</b> Efeito de nitrogênio e glicerol sobre o crescimento do microorganismo. Os cultivos representados por letras iguais têm a mesma concentração de sulfato de amônio de todos os cultivos. ....	55
<b>Figura 4.6:</b> Efeito de nitrogênio e glicerol sobre o crescimento do microorganismo. Os cultivos representados por letras iguais têm a mesma concentração de sulfato de amônio das réplicas. ....	55
<b>Figura 4.7:</b> Cultivo em frasco agitado utilizando sacarose como substrato, para <i>Bacillus sp.</i> na temperatura e agitação de 30°C e 170 rpm, respectivamente. ....	56
<b>Figura 4.8:</b> Avaliação da aeração sobre o crescimento celular, para <i>Bacillus sp.</i> na temperatura e agitação de 30°C e 170 rpm, respectivamente. ....	57
<b>Figura 4.9:</b> Consumo de glicerol durante o cultivo em biorreator batelada com temperatura em 30°, com oxigênio dissolvido de 20% e pH 7,0. ....	59
<b>Figura 4.10:</b> Avaliação do crescimento celular em glicerina em frasco agitado com temperatura e agitação mantidas a 30° e 170 rpm respectivamente. ....	60
<b>Figura 4.11:</b> Avaliação do crescimento celular em glicerol PA e glicerina, sob agitação e temperatura de 170 rpm e a 30 °C respectivamente. ....	60
<b>Figura 4.12:</b> Cromatograma do P(3HB) obtido da SIGMA-ALDRICH. ....	61
<b>Figura 4.13:</b> Cromatograma de uma amostra de células alimentadas com glicerina em frasco agitado. ....	61
<b>Figura 4.14:</b> Cromatograma de uma amostra de células alimentadas com glicerol PA em frasco agitado. ....	62
<b>Figura 4.15:</b> Cultivo da bactéria <i>Bacillus sp.</i> em biorreator batelada com temperatura em 30°, com oxigênio dissolvido de 20% e pH 7,0. ....	63
<b>Figura 4.16:</b> Cultivo da bactéria <i>Bacillus sp.</i> em biorreator batelada com temperatura em 30°, com oxigênio dissolvido de 20% e pH 7,0. ....	64
<b>Figura 4.17:</b> Cultivo da bactéria <i>Bacillus sp.</i> em biorreator batelada alimentada com as condições de temperatura em 30°, com oxigênio dissolvido de 20%, pH 7,0. A razão molar C/N utilizada foi de 7,4. ....	65
<b>Figura 4.18:</b> Perfis de pH e oxigênio dissolvido durante o processo, sobre as condições de temperatura em 30°, com oxigênio dissolvido de 20%, pH 7,0. A razão molar C/N utilizada foi de 7,4. ....	65
<b>Figura 4.19:</b> Cultivo da bactéria <i>Bacillus sp.</i> em biorreator batelada alimentada com as condições de temperatura em 30°, com oxigênio dissolvido de 20%, pH 7,0. A razão molar C/N utilizada foi de 5. ....	66

<b>Figura 4.20:</b> Perfis de pH e oxigênio dissolvido durante o processo, com as condições de temperatura em 30°, com oxigênio dissolvido de 20%, pH 7,0. A razão molar C/N utilizada foi de 5. ....	67
<b>Figura 4.21:</b> Cultivo da bactéria <i>Bacillus sp.</i> em biorreator batelada alimentada, com as condições de temperatura em 30°, com oxigênio dissolvido de 20%, pH 7,0. A razão molar C/N utilizada foi de 2,5. ....	68
<b>Figura 4.22:</b> Perfis de pH e oxigênio dissolvido durante o processo, com as condições de temperatura em 30°, com oxigênio dissolvido de 20%, pH 7,0. A razão molar C/N utilizada foi de 2,5. ....	68
<b>Figura 4.23:</b> Cultivo da bactéria <i>Bacillus sp.</i> em biorreator batelada alimentada, com as condições de temperatura em 30°, com oxigênio dissolvido de 20%, pH 7,0. A razão molar C/N utilizada foi de 2,5. ....	69
<b>Figura 4.24:</b> Perfis de pH e oxigênio dissolvido durante o processo, com as condições de temperatura em 30°, com oxigênio dissolvido de 20%, pH 7,0. A razão molar C/N utilizada foi de 2,5. ....	69
<b>Figura 4.25:</b> Perfil da massa da solução de glicerol e hidróxido de amônio (razão molar C/N de 2,5) adicionada ao sistema durante o cultivo. ....	70
<b>Figura 4.26:</b> Cultivo da bactéria <i>Bacillus sp.</i> em biorreator batelada alimentada, com as condições de temperatura em 30°, com oxigênio dissolvido de 20%, pH 7,0. A razão molar C/N utilizada foi de 1,6. ....	71
<b>Figura 4.27:</b> Cultivo em biorreator em batelada alimentada, com as condições de temperatura em 30°, com oxigênio dissolvido de 20%, pH 7,0. A razão molar C/N utilizada foi de 1,6. ....	72
<b>Figura 4.28:</b> Curvas térmicas obtidas por DSC de P(3HB) comercial. ....	74
<b>Figura 4.29:</b> Curvas térmicas obtidas por DSC de P(3HB) extraído. ....	74
<b>Figura 4.30:</b> Microscopia eletrônica do <i>Bacillus sp.</i> produtor de P(3HB). ....	76
<b>Figura 1:</b> Análise térmica de DSC da amostra de P(3HB) extraída das massas celulares. ....	920
<b>Figura 2:</b> Análise térmica de DSC do P(3HB). ....	921
<b>Figura 3:</b> Análise de RMN do P(3HB) padrão. ....	92
<b>Figura 4:</b> Análise de RMN do P(3HB) extraído das massas celulares. ....	93
<b>Figura 5:</b> Análise de RMN do P(3HB) extraído das massas celulares na faixa de 20 a 90 rpm. ....	94

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.1</b> – Polímeros biodegradáveis. ....	2
<b>Tabela 2.1</b> – Estrutura química de alguns polímeros biodegradáveis. ....	7
<b>Tabela 2.2</b> - Microorganismo e o tipo de poli(hidroxicanoatos) produzido. ....	10
<b>Tabela 2.3</b> – Propriedades dos diferentes PHAs de cadeia curta (scl), cadeia media (mcl) e cadeia longa (lcl) e do polipropileno segundo ZINN e HANY, (2005).....	18
<b>Tabela 2.4</b> – Propriedade de alguns biopolímeros e polímeros petroquímicos. ....	19
<b>Tabela 2.5</b> – Lista dos bioplásticos e microorganismos utilizados para sua degradação (SHAH <i>et al.</i> , 2008) . ....	25
<b>Tabela 3.1</b> - Composição do meio de cultivo. ....	32
<b>Tabela 3.2</b> - Composição da solução de microelementos.....	33
<b>Tabela 3.3</b> - Influência da concentração de glicerol.....	35
<b>Tabela 3.4</b> – Concentrações do sal de sulfato de amônio e glicerol utilizados nos meios fermentativos. ....	36
<b>Tabela 3.5</b> – Experimentos realizados com diferentes concentrações de sulfato de amônio e o glicerol. ....	36
<b>Tabela 3.6</b> – Diluição do meio fermentado. ....	39
<b>Tabela 3.7</b> – Preparo das amostras para análise de glicerol. ....	41
<b>Tabela 4.1</b> – Resultado do efeito da concentração de glicerol na taxa específica de crescimento.....	52
<b>Tabela 4.2</b> – Efeito da concentração de nitrogênio e glicerol sobre a taxa específica de crescimento no primeiro lote de experimentos.....	53
<b>Tabela 4.3</b> – Efeito da concentração de nitrogênio e glicerol sobre a taxa específica de crescimento no segundo lote de experimentos. ....	54
<b>Tabela 4.4</b> – Efeito da concentração de nitrogênio e glicerol sobre a taxa específica de crescimento das réplicas. ....	56
<b>Tabela 4.5</b> – Dados térmicos obtidos dos termogramas de P(3HB) padrão e amostra extraída do meio de cultivo. ....	74
<b>Tabela 4.6</b> – Deslocamento químicos de P(3HB) comercial, como padrão, análise obtida por Doi <i>et al.</i> , 1986 e Oliveira, 2004 e o P(3HB) produzido com glicerol.....	75

# Capítulo 1

## Introdução

A cada ano, uma quantidade cada vez maior de polímeros oriundos da indústria petroquímica é requerida. Existe, hoje, uma enorme quantidade de artefatos que utilizam polímeros como matéria-prima. Das garrafas de refrigerantes, passando pelas hastes de cotonetes, sacos de supermercados, tubos de encanamento, recipientes de poliestireno expandido, revestimentos de painéis e de latas de conserva, mamadeiras, tintas para paredes, próteses, escovas de dente, pára-choques de veículos, tapetes, cobertores, pneus ou suportes para componentes eletrônicos, os polímeros estão presentes em quase a totalidade dos utensílios de uso cotidiano (ROSA e CHUI, 2002).

O consumo exagerado de materiais poliméricos tem gerado problemas ambientais (SINGH *et al.*, 2005). A utilização desses materiais em vários campos que requerem resistência à luz, calor, esforço mecânico, ataques químicos e biológicos garante a longevidade do artefato plástico no meio ambiente, fazendo com que estes materiais tenham um processo de degradação mais longo. Dessa forma, a sociedade contemporânea enfrenta o problema do crescente consumo de produtos plásticos derivados da indústria petroquímica e o aumento destes produtos em aterros sanitários.

As atuais estatísticas mostram que o consumo de plásticos é de, aproximadamente, 140 milhões de toneladas por ano. Para o processamento destes polímeros usam-se, aproximadamente, 150 milhões de toneladas de óleo fósseis (SHAH *et al.*, 2006). Portanto fontes alternativas de matéria-prima para a produção de plásticos são bem-vindas.

O crescimento da população vem conduzindo ao acúmulo de enorme quantidade de resíduos não degradáveis. Após a utilização e descartes desses materiais, esses produtos acabam acumulados em aterros sanitários e aumenta o volume de lixo produzido, o que constitui uma preocupação para ambientalistas de toda a parte do mundo. Além disso, plásticos convencionais não somente levam muitas décadas para se degradarem espontaneamente, mas também produzem durante os processos de degradação compostos tóxicos (SURIYAMONGKOL *et al.*, 2006).

Neste contexto, a reciclagem de materiais poliméricos vem ganhando força, mas ainda não constitui uma solução técnica adequada, porque apenas uma fração pequena

dos produtos podem ser reciclada com vantagens econômicas. Por isso, há motivação para encontrar uma solução ecologicamente correta e ao mesmo tempo competitiva em relação á produção dos plásticos já existentes.

Uma possível solução é o uso de matéria-prima que substitua os produtos petroquímicos. Outra possível solução é o desenvolvimento de produtos que agridam menos o meio ambiente e que consigam proporcionar a mesma versatilidade de aplicação dos atuais produtos.

A biodegradação consiste na degradação dos materiais através da ação de organismos vivos. Em geral, derivam desse processo CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, componentes celulares microbianos e outros produtos. Alguns materiais poliméricos podem sofrer biodegradação como poli(3-hidroxiбутirato) P(3HB) e o poli-(ε-caprolactona) (PCL). A Tabela 1.1 lista alguns polímeros biodegradáveis. Os bioplásticos são biopolímeros naturais que são sintetizados e catabolizados por vários microorganismos (SHAH *et al.*, 2008).

**Tabela 1.1 – Polímeros biodegradáveis.**

<b>Grupo</b>	<b>Exemplos</b>
Poliésteres	Poli(α-ester), polilactonas
Polipeptídios e proteínas	Proteínas naturais
Polissacarídeos	Celulose

O P(3HB) pertence à classe dos poli(hidroxiálcanoatos), ou PHAs, e é produzido por microorganismos. O processo de produção envolve menor gasto de energia. Além disso, ao ser descartado no meio ambiente, microorganismos (como fungos entre outros) utilizam o P(3HB) para seu metabolismo, transformando-o em dióxido de carbono e água e diminuindo a quantidade de materiais presente em aterros. O tempo de degradação do P(3HB) é muito menor do que o dos polímeros convencionais. Enquanto estes levam anos, décadas ou até mesmo séculos para serem degradados em aterros sanitários, P(3HB) pode ser degradado em algumas semanas.

Um fator atrativo para a produção de PHAs por microorganismos é a grande variedade de substratos que pode ser empregada como fonte de carbono (REDDY *et al.*, 2003). O uso desses substratos, que constituem fontes renováveis, garante a contínua disponibilidade dos materiais de forma ecologicamente correta. Esses substratos podem

ser também obtidos dos combustíveis fósseis, de subprodutos de agroindústria e de outros produtos químicos.

As propriedades mecânicas do P(3HB) são frequentemente citadas na literatura como a compatibilidade com as propriedades dos polímeros comerciais (como polietileno e o polipropileno) (GAMBETTA, 2006). No entanto, a literatura especializada mostra que tais propriedades são inadequadas ao mercado, se uma etapa posterior de modificação do material não for introduzida no processo (EL-HADI *et al.*, 2002). Outro fator que favorece a substituição dos polímeros petroquímicos por biopolímeros como o P(3HB) é o fato de que estes materiais podem ser combinados em blendas com outros polímeros petroquímicos, fazendo com que o produto final possua características apropriadas para utilização em variados setores.

A demanda atual por polímeros ultrapassa a casas de centena de milhões de toneladas por ano, de maneira que a produção de biopolímeros é muito pequena, se comparada à necessidade atual. Por isso, estudos vêm sendo realizados com a finalidade de encontrar microorganismos capazes de produzir biopolímeros e de aumentar a produção. Além disso, estudam-se novos substratos, novas condições de produção, novas formas de extração de produtos e muito outros assuntos relacionados. Os trabalhos descrevem diferentes tipos de células procariontas (POIRIER *et al.*, 1995), eucariotas (BREUER *et al.*, 2002) e plantas (POIRIER, 2002), estratégias de cultivo (KOYAMA e DOI, 1993), usando linhagens selvagens capazes de produzir P(3HB). Descrevem ainda, microorganismos recombinantes (HUISMAN *et al.*, 1992), formas de aumentar a densidade celular (RYU *et al.*, 1997) e a utilização de substratos alternativos (BRAUNEGG *et al.*, 1998).

O atual estágio da indústria de polímeros petroquímicos requer alto controle da quantidade dos produtos finais e redução das perdas. Para isso, são desenvolvidos modelos de polimerização e modelos matemáticos do processo. Esse estágio ainda não é comum no ambiente de produção dos PHAs (GAMBETTA, 2006), o que colabora com o desenvolvimento pouco acelerado desse setor.

Vários estudos mostram que 40% do custo de produção dos PHAs são devidos ao substrato utilizado para a produção e que 26% estão relacionados com a recuperação do polímero (CHE *et al.*, 2003). Por tanto, o uso de substratos mais baratos pode impactar significativamente a produção de PHAs e encorajar o desenvolvimento de novos processos industriais.

## **1 Objetivos da dissertação**

Este trabalho tem como objetivo principal estudar um método de produção de P(3HB) a partir de uma fonte alternativa de carbono: o glicerol gerado como resíduo da produção do biodiesel. O microorganismo utilizado foi o *Bacillus sp.*

O uso do glicerol está relacionado à enorme disponibilidade dessa matéria-prima no Brasil, como resultado de produção do biodiesel. Hoje, o glicerol está sendo acumulado e queimado como fonte de energia. No entanto, pouco claro que o uso mais racional dessa matéria-prima para a produção de material de maior valor agregado pode contribuir sobremaneira com a indústria química racional e com a indústria de polímeros em particular.

O microorganismo *Bacillus sp* é usado neste trabalho porque trabalhos anteriores do grupo (GAMBETTA, 2006) mostraram que esse bacilo é capaz de metabolizar o glicerol e de produzir P(3HB). Portanto, este microorganismo parece adequado para conduzir a tarefa aqui proposta.

## **2 Estrutura da dissertação**

O Capítulo 2 apresenta uma revisão da literatura de biopolímeros. São descritas as principais formas de produção, os principais microorganismos estudados, as técnicas de purificação empregadas, os diferentes tipos de poli(hidroxicanoatos), suas propriedades, as vantagens e desvantagens dos distintos processos de produção e os substratos usualmente utilizados.

O Capítulo 3 faz uma descrição das técnicas empregadas nesse trabalho. Descrevem-se os materiais utilizados e as condições de análise usadas para caracterização de amostras.

O Capítulo 4 apresenta um estudo visando avaliar o crescimento celular e a produção de biopolímero em meio de cultura contendo glicerol como única fonte e carbono. Após a avaliação destes dados, realizaram-se análises para avaliar o acúmulo de biopolímero. Em função dos resultados obtidos substituiu-se o glicerol PA por glicerina proveniente de plantas de produção de biodiesel. Os estudos foram realizados em frascos agitados e em biorreator. Amostras de células contendo biopolímero foram extraídas e caracterizadas.

O Capítulo 5 apresenta as principais conclusões obtidas e algumas sugestões para trabalhos futuros.

## Capítulo 2

### Revisão Bibliográfica

#### 2.1 Polímeros da classe dos poli(hidroxicanoatos)

Poli(hidroxicanoatos) (PHAs) são poliésteres biossintetizados por bactérias, quase sempre em condições de crescimento desfavoráveis. O poli(3-hidroxi-butirato) é o membro mais conhecido da família dos PHAs (LEE e GILMORE, 2003). Os poli(hidroxicanoatos) são poliésteres de 3-, 4-, 5- e 6-ácido hidroxicanoico produzido por várias espécies de bactérias. Suas propriedades variam muito, dependendo dos monômeros constituintes (ROY *et al.*, 2007).

Os PHAs foram observados pela primeira vez em *Azobacter chroococcum* no início do século 20, como inclusões similares aos lipídeos e solúveis em clorofórmio. Contudo, somente em 1926 as inclusões produzidas por *Bacillus megaterium* foram identificadas como constituídas de ácidos poli(3-hidróxi-butírico) P(3HB), um homopolímero, no Instituto Pasteur, por Lemoigne (ZINN *et al.*, 2001).

Algumas espécies de microrganismos são capazes de acumular uma fonte de reserva de energia ou de carbono na forma de inclusões de poliésteres isotáticos (os ramos são ordenados regularmente do mesmo lado da cadeia), insolúveis no citoplasma (DAWES e RIBBONS, 1962). Estes poliésteres apresentam massas molares na faixa de  $2 \cdot 10^5$  a  $3 \cdot 10^6$  g.mol<sup>-1</sup>. O acúmulo do biopolímero ocorre quase sempre quando há uma condição desfavorável ao seu crescimento. A condição desfavorável é gerada pela exaustão de algum nutriente essencial, tal como nitrogênio, fósforo ou oxigênio (STEINBUNCHEL e FUCHTENBUSCH, 1998). A falta de outros nutrientes, como magnésio e enxofre são também eficazes para o acúmulo de PHAs em determinados microrganismos. Alguns estudos mostram acúmulos de até 90% da massa celular em P(3HB) (REDDY *et al.*, 2003).

Os PHAs são poliésteres insaturados e são normalmente classificados quanto ao comprimento de cadeia do monômero que constitui o polímero em três categorias: comprimento curto de cadeia (scPHAs – C3 a C5), comprimento médio de cadeia (mcPHAs – C6 a C14) e o comprimento longo de cadeia (lcPHAs – maior que C14) (LEE, 1996). PHAs possuem como características marcantes a biodegradabilidade, a

biocompatibilidade; a termoplasticidade, a impermeabilidade ao ar e a insolubilidade em água. Além disso, possuem propriedades piezelétricas e exibem alto grau de polarização (STEINBÜCHEL e LÜTKE-EVERSLOH, 2002). Os sclPHAs têm propriedades próximas das propriedades dos plásticos convencionais. Eles são tipicamente rígidos e altamente cristalinos (RAMSAY *et al.*, 2006), fazendo com que este seja o grupo de PHAs mais estudados. Os msclPHAs são elastômeros (SHAH *et al.*, 2006). O P(3HB) faz parte do grupo sclPHA e é o tipo de PHA mas comum na natureza (TSUGE, 2002). Um grande número de monômeros já foi identificado como constituinte fundamental de PHAs (ZINN *et al.*, 2001). A Tabela 2.1 ilustra a estrutura particular do P(3HB).

**Tabela 2.1** – Estrutura química de alguns polímeros biodegradáveis.

Polímero	Estrutura química
Poli(3-hidroxiacetato)	$\left[ \text{O} - \overset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_2 - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_n$

Além dos homopolímeros, sabe-se que vários copolímeros são também sintetizados por microorganismos, tais como poli(3-hidroxiacetato-co-4-hidroxiacetato) ou [P(3HB-co-4HB)], poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato) ou [P(3HB-co-3HV)], poli(3-hidroxiacetato-co-hidroxiacetato) ou [P(3HB-co-HHx)] e o poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato) ou [P(3HB-co-3HP)]. O copolímero [P(3HB-co-3HV)] pode ser uma alternativa para a produção de termoplásticos sintéticos, devido as suas melhores propriedades físicas e mecânicas, baixa cristalinidade e sua ótima flexibilidade, quando comparadas às do P(3HB) (SUDESH *et al.*, 2008). Como o P(3HB) puro é um composto com propriedades inadequadas para o mercado de plástico, e como o caminho metabólico responsável pela produção de P(3HB) é também capaz de produzir o copolímero P(3HB-3HV) na presença de propionil-CoA, quetovaleril-CoA ou hidroxiacetil-CoA, essa rota metabólica é bastante explorada para a produção do copolímero (DAAE e DUNNILL, 1999).

## 2.2 História evolutiva do estudo do poli(3-hidroxibutirato) e os (PHA)

Beijerinck foi o primeiro a observar grânulos de PHAs em células de bactérias em 1888 (SHAH *et al.*, 2006). Os PHAs foram observados pela primeira vez em *Azobacter chroococcum* no início do século 20, como inclusões similares aos lipídeos, e solúveis em clorofórmio. Somente em 1926 as inclusões produzidas por *Bacillus megaterium* foram descritas como constituídas por ácidos poli(3-hidróxi-butírico) (P(3HB)) no Instituto Pasteur por Lemoigne.

Durante os 30 anos seguintes não houve qualquer interesse por este material desconhecido. O primeiro artigo devotado ao P(3HB) foi publicado em 1958 por Macrae e Wilkinson. Eles reportaram a rápida degradação do P(3HB) produzido por *Bacillus megaterium* e por *Bacillus cerus*. O interesse pelo P(3HB) aumentou então drasticamente. Nos anos seguintes, pesquisas com P(3HB) e outros PHAs expandiram-se, incluindo investigações de outros microorganismos produtores e o uso potencial desses biopolímero em diferentes aplicações (SHAH *et al.*, 2006).

Na década de 70, com a crise do petróleo e a grande elevação do preço do barril de petróleo, houve um aumento ainda mais significativo das pesquisas sobre os PHAs. A primeira empresa a desenvolver um processo comercial, a ICI, que o comercializou com o nome de BIOPOL, produzia o polímero através do cultivo de *Ralstonia eutropha* em meio contendo glicose e ácido propiônico como fontes de carbonos. Alguns produtos foram então comercializados pela Alemanha (LEE, W.-H. *et al.*, 2008). Com o fim da crise de petróleo e alto custo da produção de PHAs, o interesse por este material voltou a diminuir. No Brasil, o PHA é produzido atualmente a partir de melaço de cana-de-açúcar, enquanto nos Estados Unidos e na Coréia os PHAs são produzidos a partir de vários substratos de origem animal (ALMEIDA *et al.*, 2004).

O poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) ou [P(3HB-co-3HV)] foi produzido comercialmente como BIOPOL pela Zeneca Bio Products, Billingham, Reino Unido (SUDESH *et al.*, 2006). Uma segunda linha de produção comercial esta baseada na fermentação de sacarose, pela Chemie Linz GmbH na Áustria (AKIYAMA *et al.*, 2002). No Brasil, uma planta piloto para a produção de 60 toneladas por ano de homopolímero é integrada a uma usina de produção de açúcar e etanol, utilizando os resíduos da usina como matéria-prima (DOI *et al.*, 2002).

### 2.3 Microrganismos produtores de poli(hidroxialcanoatos)

O número de microrganismos produtores de PHAs aumenta a cada ano. Em 2003, Reddy havia catalogado 75 gêneros diferentes de microrganismo capaz de produzir PHAs. Hoje, já são conhecidos 150. Dentre esses, as bactérias *Alcaligenes latus* e *Cupriavidus necator* são certamente as mais estudadas (TOKIWA e UGWI, 2007).

Os poli(hidroxialcanoatos) representam uma classe de poliésteres complexos, sintetizados por vários gêneros de bactérias e membros da *Archae*. Os microrganismos mais estudados são os *Alcaligenes sp.*, *Azotobacter sp.*, *Bacillus sp.* e *Pseudomonas sp.* (JIANG *et al.*, 2007). Os PHAs são acumulados no citoplasma das células como inclusões insolúveis de 0,2 µm a 0,5 µm de diâmetro, envolvidas por uma membrana (MANTZARIS *et al.*, 2002; SERAFIM *et al.*, 2002)

A bactéria *Cupriavidus necator* é um dos microrganismos mais utilizados para a produção de PHAs, que cresce com facilidade em meios simples e alcança grandes acúmulos de PHAs. Apesar disso, os mecanismos bioquímicos usados para a síntese de PHB não são bem compreendidos (KIM *et al.*, 1994). Embora o primeiro microrganismo identificado como produtor de PHAs tenha sido *Bacillus megaterium* em 1926, mas somente em 1970 os grânulos foram vistos em microscópio e de fato catalogados como poli(hidroxialcanoatos).

Vários artigos citam os seguintes microrganismos como capazes de acumular PHAs: *Azotobacter beijerincki*, *Pseudomonas putida*, *Alcaligenes latus*, *Actinomycetes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Chlorogloea*, *Chromatium*, *Dexia*, *Ferrobacillus*, *Hyphomicrobium*, *Lampropaedia*, *Methylobacterium*, *Micrococcus*, *Noiscardia*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Sphaerotilus*, *Spirillum*, *Streptomyces vibrio* e *Zoogloea* (BYROM, 1987). Na Tabela 2.2 são apresentados alguns microrganismos produtores de PHAs. Podem ser ainda citadas as linhagens selvagens de cianobactérias, como *Synechococcus sp* MA19 (TSUGE, 2002). Estudos mostram que os microrganismos que acumulam PHAs podem ter uma composição aproximada de 98% de PHB e 2% de proteínas, além de pequena quantidade de lipídios (WATT e MORGAN, 1990).

Podem ser encontrados estudos sobre a manipulação genética de microrganismos para a produção de PHAs. Os principais estudos se concentram na utilização de *Escherichia coli* recombinante (PARK *et al.*, 2005). As linhas de pesquisa para a

produção de PHAs através do uso de técnicas de engenharia genética dividem-se em duas estratégias: a incorporação de genes para a utilização de diferentes substratos em células produtoras de PHAs; introdução de genes para biossíntese de PHA em células não produtoras de PHAs. Genes responsáveis pela síntese de P(3HB) de *R. eutropha H16* já foram clonados e expressos em *E. coli*. O cultivo em batelada alimentada com controle de pH mostrou uma produção de 89 g/L (KIM *et al.*, 1994).

**Tabela 2.2-** Microorganismo e o tipo de poli(hidroxicanoato) produzido.

<b>Microorganismo</b>	<b>Poli(hidroxicanoato)</b>
<i>Cupriavidus necator</i> Renomeada para <i>Alcaligenes eutrophus</i>	P(3HB) e P(3HB-co-3HV)
<i>Alcaligenes latus</i>	P(3HB)
<i>Azobacter vinelandii</i>	P(3HB)
<i>Chromobacterium violaceum</i>	P(3HV)
<i>Methylobacterium organophilum</i>	P(3HB)
<i>Azobacter chroococcum</i>	P(3HB)
<i>Protomonas extorquens</i>	P(3HB)
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	P(3HB) e P(3HHx-co-3HO)
<i>Escherichia coli recombinante</i>	P(3HB)
<i>Bacillus meheterium</i>	P(3HB)
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	P(3HV)
<i>Pseudomonas putida</i>	P(3HB)

Dentre os microorganismos, as bactérias têm mostrado maior eficiência para produção de P(3HB), incluindo *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, além de várias leveduras metilotróficas e *Escherichia coli* recombinante. A bactéria *Alcaligenes latus* não requer limitação de nutrientes para a eficiente biossíntese de PHA, na presença em excesso de fonte de carbono. Os possíveis efeitos de limitação de oxigênio sobre a produção do copolímero por *A. latus* e a composição do cromonômero foi verificando que o teor de oxigênio dissolvido não influencia a síntese de P(3HB).

As plantas também foram utilizadas para a produção de PHAs, utilizando a fonte de energia mais barata que se conhece: a energia solar. Foram introduzidos através da engenharia genética os genes bacterianos responsáveis pela síntese do PHAs. A

produção de PHA foi da ordem de miligramas, o que não é suficiente para satisfazer a demanda mundial de polímeros. No entanto esses estudos são encorajadores. Os estudos realizados com plantas mostraram um acúmulo de P(3HB) em folhas *Arabidopsis* transgênicas de 20 µg/g a 100µg/g (POIRER *et al.*, 1995).

Para utilizar plantas para a produção de PHA é necessário solucionar uma série de problemas. Por exemplo, o metabolismo vegetal está altamente compartimentalizado, o que dificulta a tarefa, já que é necessário que os genes *pha* sejam expressos no compartimento celular que contém a maior concentração de acetil-CoA, ao mesmo tempo em que se impede que o crescimento da planta seja afetado (ALMEIDA *et al.*, 2004).

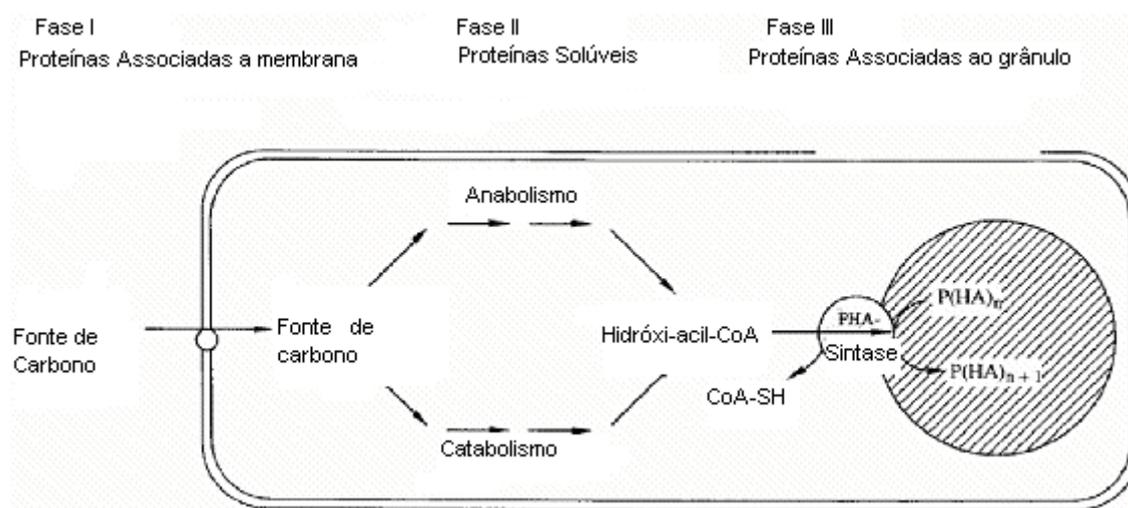
Alguns grupos de bactérias, incluindo a *Ralstonia eutropha* (renomeada, *Cupriavidus necator* e novamente renomeada como *Alcaligenes eutropha*), *Prodomonas extorquens* e *Protomonas oleovorans*, requerem limitação de nutrientes essenciais, tais como nitrogênio, magnésio, fósforo ou enxofre, para a produção de PHAs. Assim, duas etapas, são requeridas no processo fermentativo. Durante a primeira etapa, as células são supridas com quantidades suficientes de nutrientes (o objetivo é aumentar a concentração celular). Na segunda etapa, a limitação de um nutriente é aplicada para a produção de P(3HB) nas células. Por outro lado, alguns microorganismos, como *Alcaligenes latus* e *Azotobacter vinelandii*, não requerem limitação de nutrientes nem que a fermentação seja realizada em duas etapas, uma vez que o crescimento é associado à produção de P(3HB) (TOKIWA e UGWI, 2007). Isso é muito conveniente para a produção industrial. *Pseudomonas putida* podem ainda produzir PHAs com grupos funcionais modificados como ciamo, nitrofenóxi, fenóxi, metilfenóxi e com ligações triplas entre os carbonos da cadeia (RHEE *et al.*, 2000).

Todos os PHAs descobertos até agora apresentam configuração isotática [R], devido á estereoespecificidade da enzima. A quiralidade do 3(β)-carbono é responsável pela atividade ótica desses polímeros (LEE e GILMORE, 2003). Pesquisas revelaram que P(3HB) de baixo massa molar é também encontrado em células eucariotes, como em leveduras, amendoim, espinafre, intestino de ovelha, músculo de gatos, etc. Assim, não é surpresa que o PHB apresente excelente biocompatibilidade com células animais (ZINN *et al.*, 2001).

## 2.4 Biossíntese de PHAs

A composição do PHA produzido depende muito do substrato usado (BRANDL *et al.*, 1988, HUISMAN *et al.*, 1989). A reação usual que resulta na produção de PHAs é a conversão de HA, fornecido como fonte de carbono às células por uma tioquinase ou uma transferase-CoA associada, ao tioéster HA-CoA correspondente (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995).

Observando-se o processo genérico de biossíntese dos PHAs, três fases podem ser claramente identificadas. A primeira fase esta associada à absorção de uma fonte de carbono, passível de participação na biossíntese do PHA. Essa absorção pode ser realizada por um sistema de transporte específico ou por difusão através da membrana celular. Uma segunda etapa esta relacionada às reações anabólicas e/ou catabólicas, responsáveis pela geração de compostos do tipo hidróxi-acil coenzima-A tioéster, que são substratos para a PHA sintase. A terceira e última etapa está associada à biossíntese do PHA, quando PHA sintases usam os tioésteres como substratos e catalisam a formação da ligação éster do polímero. Um esquema simplificado desse processo foi apresentado por STEINBÜCHEL e VALENTIN em (1995) e GAMBETTA em (2006) e está representado na Figura 2.1.



**Figura 2.1:** Esquema simplificado da biossíntese dos PHAs adaptado (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995).

Os PHAs são sintetizados por bactérias para armazenamento de energia e carbono, normalmente na presença de excesso de fonte de carbono e em condições de limitação de um dos nutrientes essenciais, como nitrogênio, enxofre, fósforo ou

oxigênio (ROY *et al.*, 2007). Várias bactérias conseguem converter acetil-CoA a D-(-)-3-hidroxi-butiril-CoA, pela via do acetoacetil-CoA, dando origem ao poli-hidroxi-butirato (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995).

A via biossintética de produção do P(3HB) envolve ao menos três reações enzimáticas, catalisadas por três enzimas diferentes. A primeira reação consiste da condensação de duas moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA pela  $\beta$ -cetotiolase. A segunda reação envolve a redução de acetoacetil-CoA a (R)-3-hidroxi-butiril-CoA por uma acetoacetil-CoA desidrogenase NADPH dependente. Finalmente, os monômeros (R)-3-hidroxi-butiril-CoA são polimerizados pela P(3HB) polimerase (HUISMAN *et al.*, 1989).

A formação dos grânulos *in vitro* foi investigada por GERNGROSS e MARTIN (1995). Este estudo permitiu inferir a maneira como os grânulos se formam no interior da célula. Em um primeiro momento, a P(3HB) polimerase solúvel interage com concentrações cada vez mais altas de 3-hidroxi-butiril-CoA no citoplasma, resultando na ativação da enzima por um mecanismo desconhecido. Durante uma fase inicial, os oligômeros são lentamente formados, gerando micelas, à medida que crescem em comprimento e hidrofobicidade. Estas micelas formam duas fases (aquosa e polimérica), enquanto a PHA polimerase permanece na interface. A enzima então produz mais polímero de forma contínua, o qual é liberado no interior do grânulo. As micelas finalmente coalescem e forma grânulos que podem ser observados por microscopia.

Como já dito, a composição dos PHAs depende da natureza e da fonte de carbono (SERAFIM *et al.*, 2002). LEMOS (1998) mostrou que o propionato produz essencialmente um polímero de 3-hidroxi-valerato, com pequenas quantidades de butirato. Na presença de acetato, P(3HB) é o principal produto.

## **2.6 Produção de Poli(hidroxicanoatos)**

É possível produzir PHA de duas maneiras: *in vitro*, via polimerização catalisada por PHA polimerase; ou *in vivo*, por fermentação submersa conduzida em batelada, batelada alimentada ou de forma contínua (ZINN *et al.*, 2001). Até recentemente a única forma de produzir PHAs era através da fermentação submersa. Ultimamente tem sido proposto o uso de fermentação em estado semi-sólido (FSS) como uma alternativa para a produção de PHAs. A FSS freqüentemente exige baixo capital de investimento e

permite o uso de resíduos agroindustriais como meio de cultura. Assim, podem ser empregados produtos de baixos custos que contribuem para resolver o problema da disposição destes produtos no meio ambiente (CASTILHO *et al.*, 2006).

Outros métodos de produção de PHAs têm sido estudados. Atualmente, as três principais técnicas usadas envolvem síntese química (abrindo anéis por polimerização de  $\beta$ -lactonas), uso de células de plantas transgênicas e a fermentação com microorganismo (WU *et al.*, 2007), que é, certamente, o método mais popular. Vários estudos realizados em plantas para a produção de PHAs podem ser encontrados na literatura. As plantas oferecem como vantagem principal o baixo custo de produção. Foi reportada a síntese de P(3HB) por *Arabidopsis thaliana*, atingindo até 14% de polímero em relação à massa celular seca segundo DAAE e DUNILL (1999).

### **2.6.1 Produção de PHA *in vitro***

A produção de PHA *in vitro* tem algumas vantagens em relação à produção de PHA *in vivo*. A primeira vantagem está relacionada à facilidade na operação downstream, já que o PHA não precisa ser extraído das células. A redução dos custos pode chegar a 27% no preço final do PHA (ZINN *et al.*, 2001). Outra vantagem está associada ao controle da produção e da quantidade final do polímero obtido através da adição de precursores e cofatores de PHAs (QI *et al.*, 2000). A adição destes cofatores, no entanto, dificulta reciclagem e eleva o custo final do processo.

### **2.6.2 Produção de PHA *in vivo***

Este tipo de produção de PHA é o mais encontrado na literatura. Uma enorme variedade de microorganismos e de meios de cultivo pode ser utilizado a produção de PHAs, de forma contínua, semi-contínua ou em batelada (VALAPPIL *et al.*, 2007).

A produção de PHA por batelada é geralmente utilizada pelos pesquisadores para estudar o crescimento dos microorganismos e a influência de fatores como agitação, oxigênio dissolvido, concentração de nutrientes, pH, temperatura e outros sobre a produtividade e a qualidade dos polímeros produzidos (ZINN *et al.*, 2001). Alguns microorganismos que não acumulam PHA durante seu crescimento, como *Alcaligenes eutropha*, são cultivados em processo em batelada realizado em duas etapas: uma etapa com excesso de fonte de carbono e nutrientes essenciais, com a

finalidade de promover o aumento da concentração celular; e uma segunda etapa em que há excesso de fonte de carbono e deficiência de ao menos um dos nutrientes essenciais, com a finalidade de promover acúmulo de PHA. O nutriente alimentado de forma deficiente depende do microorganismo em estudo.

O processo realizado em batelada alimentada é normalmente iniciado logo após a fase de crescimento exponencial (OLIVEIRA, 2004). O processo é constituído por duas fases principais. Em uma primeira fase, as células são cultivadas em um meio mineral, contendo nutrientes essenciais, glicose e baixa concentração de fosfato. O crescimento celular ocorre até que todo o fosfato seja consumido pelas células, quando então se inicia a segunda fase. Nesta segunda fase, o acúmulo de PHA é obtido através da contínua adição de glicose e ácido propiônico ao cultivo. O processo é paralisado quando a quantidade de PHA contido nas células atinge um nível de 70-80% de massa celular seca. É importante observar que a presença de ácido propiônico em alta concentrações inibe o crescimento celular (OLIVEIRA, 2004).

Alguns processos semi-contínuos são realizados desta maneira desde do início do cultivo.

## **2.8 Extração dos poli(hidroxicanoatos)**

Existem na literatura diversos trabalhos que estudam a extração do biopolímero da célula. Todos os resultados indicam que esta etapa é crítica e que estudos adicionais ainda precisam ser realizados. As técnicas de extração existentes são muito trabalhosas e poucas eficientes, causando até mesmo a degradação do material polimérico. As extrações são normalmente realizadas usando solventes orgânicos, como clorofórmio, cloreto de metileno, carbonato de propileno e dicloroetano (ROY *et al.*, 2007). A lise das células é quase sempre feita com solução hipoclorito de sódio, enquanto a extração com clorofórmio em um aparato de soxhlet é a técnica de extração mais comum. Os métodos de extração envolvem tratamentos a quente com solventes orgânicos, solubilização enzimática e posterior lavagem com surfactantes (RAMSAY *et al.*, 2006). Por isso estes métodos têm custos elevados e aumenta o valor do produto final obtido.

Um processo para extração de PHAs envolve, invariavelmente, três etapas: pré-tratamento da biomassa, extração com solvente e purificação do polímero. Na etapa de pré-tratamento, podem ser incorporadas enzimas para a degradação das proteínas e do DNA, pode ser usado aquecimento para desnaturar as macromoléculas celulares, podem

ser aplicados surfactantes para remover lipídeos e são usados solventes para remover água e lipídeos polares. A extração de scl-PHA por solvente envolve hidrocarbonetos halogenados, como clorofórmio. O mcl-PHA é solúvel em um número maior de solventes, de forma que extração é mais barata e menos tóxica (RAMSAY *et al.*, 2006). A acetona é o solvente mais usado para a extração de mcl-PHA, enquanto o metanol é usualmente usado como um não solvente para a precipitação do PHAs (RHEE *et al.*, 2000). A vantagem de usar enzimas durante a extração está associada a especificidade desses compostos, favorecendo uma maior recuperação de produtos, ao mesmo tempo que forma menos quantidade de produtos degradados (KAPROTCHKOFF *et al.*, 2005).

A ação do solvente durante a extração pode ser dividida em dois estágios: primeiro ele modifica a permeabilidade da membrana celular e, então, ele dissolve o PHA. O uso de solvente foi primeiramente descrita por Leimogne (1923) e Baptist (1967). Eles usaram hidrocarbonetos clorados, tais como clorofórmio e 1,2 dicloroetano, e alguns carbonatos, como propileno e etileno carbonatos (WU *et al.*, 2007).

O uso de surfactantes, tal como sulfato dodecil aniônico de sódio (SDS), provoca o rompimento da membrana plasmática liberando o P(3HB) para o meio, juntamente com os debrís celulares. Outra função do surfactante é a solubilização de proteínas e de outros materiais celulares (WU *et al.*, 2007).

Um método alternativo para a recuperação dos PHAs é baseado na digestão enzimática. O método foi desenvolvido por ZENECA (AKIYAMA *et al.*, 2003), que observou que algumas enzimas exercem efeitos expressivos sobre a dissolução de proteínas e pouco efeito sobre a degradação do biopolímero. O uso de enzimas conduz a bons níveis de recuperação, mas seu alto custo é a principal desvantagem desse processo (WU *et al.*, 2007).

O rompimento mecânico de células é amplamente usado para recuperar proteínas intracelulares. O rompimento mecânico pode ser feito com sólidos ou líquidos a altas pressões (WU *et al.*, 2007), embora o uso dessa técnica não seja comum para a recuperação de PHAs em função do alto custo do processo.

## **2.7 Determinação de Poli(hidroxicanoato)**

É de suma importância que um método apropriado seja usado para determinar e quantificar a produção de P(3HB). Os primeiros métodos desenvolvidos foram

gravimétricos (LEMOIGNE, 1926), nefelométricos (WILLIAMSON e WILKINSON, 1958) e espectrofotométrico (LAW e SLEPECKYL, 1961; JÜTTNER *et al.* 1975). Muitos métodos analíticos tradicionais são insensíveis aos PHAs, envolvem passos de purificação tediosos e, com frequência, não são capazes de distinguir entre o PHB e o PHV. O PHB e o PHV podem ser determinados por extração (em clorofórmio e/ou metanol) e subsequente despolimerização, sendo os monômeros caracterizados por cromatografia gasosa. O método mais amplamente utilizado é de metanólise ácida, realizada na presença de clorofórmio, seguida por análise de cromatografia gasosa dos ésteres monoméricos. Este método foi desenvolvido por BRAUNEGG *et al.* (1978) e leva à recuperação de 50 – 60% do monômero segundo JAN *et al.* (1995). Um método melhorado foi proposto por SMOLDERS *et al.* (1994), combinando características introduzidas por COMEAU *et al.* (1988) e RIIS e MAI (1988). Este método envolve a liofilização da amostra e a transesterificação com propanol na presença de ácido hidrolórico e 1,2-dicloroetano. Depois de lavar a fase orgânica com água é feita a secagem com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e análise dos ésteres monoméricos por cromatografia gasosa (ZEHNDER *et al.*, 1998).

## 2.9 As propriedades dos poli(hidroxicanoatos)

Os PHAs são usados como reservas de energia e de carbono pelos microorganismos que os produzem. Os microorganismos produtores de PHA acumulam o polímero quando existe excesso de nutriente no meio de cultivo. De forma similar, os grânulos de PHA são consumidos quando o meio se torna desfavorável para sua sobrevivência. Como já dito, esses biopolímeros são acumulados nas células quando os microorganismos são submetidos a condições de estresse (SHAH *et al.*, 2006).

Os PHAs são tipicamente produzidos como polímeros que contêm 10<sup>3</sup> ou 10<sup>4</sup> unidades méricas, acumuladas como inclusões de 0,2 a 0,5 µm de diâmetro (SHAH *et al.*, 2006). Essas inclusões ou grânulos são sintetizados e armazenados por bactérias gram-positivas e gram-negativas.

O poli(3-hidroxiбутирато) é o PHA mais comumente encontrado na natureza e foi descoberto em 1926 no *Bacillus megaterium* por Lemoigne, 1926. Sua característica mais marcante é o fato de ser biodegradável e biocompatível, o que é raro em materiais de origem petroquímica. A maioria dos compostos de alta massa molar que apresentam biodegradabilidade é formada por poliésteres (ROSA e CHUI, 2002). O grupamento

éster é facilmente hidrolisado por fungos e/ou bactérias. As propriedades dos poliésteres vão desde plásticos rígidos a polímeros dúcteis.

PHAs podem substituir plásticos tradicionais feitos de petróleo em várias aplicações por terem propriedades comparáveis às dos polímeros petroquímicos. A Tabela 2.3 mostra uma comparação entre as propriedades de diferentes PHAs e do polipropileno. Os PHAs de cadeia longa (lcl-PHA) ainda são poucos estudados, porque os microorganismos produtores de polímeros não produzem cadeias muito longas.

**Tabela 2.3** – Propriedades dos diferentes PHAs de cadeia curta (scl), cadeia média (mcl) e cadeia longa (lcl) e do polipropileno segundo ZINN e HANY, (2005).

	<b>scl-PHA</b>	<b>mcl-PHA</b>	<b>lcl-PHA</b>	<b>Polipropileno</b>
<b>Cristalinidade (%)</b>	40-80	20-40	-	70
<b>Ponto de fusão (°C)</b>	80-180	30-80	-	176
<b>Densidade (g.cm<sup>-3</sup>)</b>	1,25	1,05	-	0,91
<b>Extensão de rompimento (%)</b>	6-10	300-450	-	400
<b>Resistência a Luz UV</b>	boa	boa	boa	Fraca
<b>Resistência a solventes</b>	fraca	fraca	fraca	boa

As propriedades térmicas dos PHAs são muito dependentes da massa molar. A temperatura de fusão ( $T_m$ ) e a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) aumentam com o aumento da massa molar para compostos de baixa massa molar, mas variam pouco para compostos de alta massa molar. A composição monomérica dos copoliésteres é um outro fator que influencia significativamente a  $T_g$  e  $T_m$  dos mesmos. Frequentemente os PHAs são produzidos como copolímeros de 3-hidroxibutirato e de 3-hidrovalerato (ALMEIDA *et al.*, 2004). Quando a quantidade relativa de 3-hidrovalerato aumenta, o ponto de fusão é reduzido (OLIVEIRA, 2004). A Tabela 2.4 apresenta um resumo de algumas propriedades térmicas e mecânicas importantes para alguns polímeros.

O módulo de Young do P(3HB) é usualmente igual a 3,5 GPa e a resistência à tração é igual a 43 Mpa. Essas propriedades podem ser comparadas às do polipropileno. Entretanto, a capacidade de alongação até a ruptura do P(3HB) é significativamente inferior à do polipropileno, o que torna o P(3HB) muito frágil (FREIR, 2002). As causas desta fragilidade podem ser oriundas da cisão e degradação das cadeias poliméricas e da

propagação das rachaduras ao redor dos esferulitos, dada a elevada cristalinidade dos PHAs (OLIVEIRA, 2004).

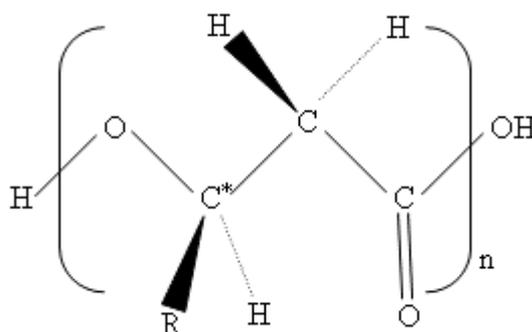
**Tabela 2.4** – Propriedade de alguns biopolímeros e polímeros petroquímicos.

Polímeros	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>g</sub> (°C)	Cristalinidade (%)	Resistência a tração (MPa)	Extensão de quebra (%)
P(3HB)	177	4	60	43	5
P(3HB) com alta massa molecular	185	4	80	400	35
P(3HB-co-20 mol%3HV)	145	-1	56	20	50
P(3HB-co-16 mol%4HB)	150	-7	45	26	444
P(3HB-co-10 mol%3HHx)	127	-1	34	21	400
P(3HB-co-6 mol%3HA)	133	-8	45	17	680
Polipropileno	176	10	50-70	38	400
Poietileno de baixa densidade	130	-36	20-50	10	620

Os PHAs produzidos por bactérias são polímeros lineares de (R)-3- hidróxido ácido, nos quais o grupo carboxílico de um monômero forma uma ligação tipo éster com o grupo hidroxila do monômero seguinte (ALMEIDA et al., 2004), como apresentado na Figura 2.2. Os PHAs são termoplásticos que, mesmo depois de moldados, podem voltar ao estado fundido por aquecimento, permitindo a confecção de outras peças. Esses materiais são cristalinos, opticamente ativos e isotáticos, apresentando características piezoelétricas e como são insolúveis em água e impermeáveis ao ar, podem ser usados para a fabricação de embalagens, constituindo um substituto potencial do polipropileno em varias aplicações (MADISON e HUISMAN, 1999). Dependendo do tipo de microorganismo e substrato alimentado, os PHAs podem apresentar diferentes composições (REIS *et al.*, 1998).

Os PHAs podem ser processados por injeção e por moldagem com sopro. Contudo, em função da alta cristalinidade, os PHAs não são flexíveis o suficiente para formar filmes. Por isso, são quebradiços e apresentam propriedades elásticas muito pobres. Estas limitações podem ser contornadas através da mistura com outros polímeros e/ou aditivos (HÄNGGI, 1995). Os copolímeros são mais dúcteis, mais fáceis de moldar e mais resistentes, quando comparados com os homopolímeros. As misturas

de P(3HB) com outros polímeros, tais como polilactatos e poli( $\epsilon$ -caprolactona), contornam os problemas de rigidez e fragilidade excessivas do P(3HB), possibilitando seu uso prático (TSUGE, 2002).



**Figura 2.2:** Estrutura química do PHA. Todos os monômeros têm um centro quiral (\*), n pode variar de 100 – 30000 monômeros e R indica um radical alquila.

Outra forma de melhorar as propriedades físicas de P(3HB) é a incorporação de diferentes unidades de HA na seqüência polimérica, para formar copolímeros. Muitas unidades monoméricas já foram identificadas como constituintes dos PHAs armazenados em microorganismo. As unidades de repetição apresentam a estrutura geral apresentada na Figura 2.3, em que a substituição do radical R caracteriza um novo polímero ou copolímero. Os hidroxialcanoatos que formam os PHAs podem ser divididos em duas classes: hidroxialcanoatos de comprimentos de cadeia curta, compreendendo monômeros com 3 a 5 carbonos; e hidroxialcanoatos de cadeia média, compreendendo os monômeros com 6 a 14 carbonos.

Estudos têm mostrado que a massa molar do PHAs varia tipicamente de 50000 a 1.000.000 Da, dependendo do organismo produtor do PHA e das condições de produção (REDDY *et al.*, 2003). O P(3HB) é opaco, enquanto que o copolímero PHBV torna-se transparente, à medida que aumenta o conteúdo de 3HV.

Estudos mostraram que a composição de PHA depende principalmente da fonte de carbono, das condições de cultivo e da rota metabólica que leva à formação do PHA (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995).

A estrutura química dos PHAs apresenta grupos funcionais nas extremidades das moléculas, permitindo que o material seja modificado quimicamente, o que certamente aumenta o número de aplicações possíveis desse material (ZINN *et al.*, 2001).

	<i>n</i>	<i>R</i>	<i>Nome</i>
	1	Hidrogênio	Poli(3-hidroxi-propionato)
		Metil	Poli(3-hidroxi-butirato)
		Etil	Poli(3-hidroxi-valerato)
		Propil	Poli(3-hidroxi-hexanoato)
		Pentil	Poli(3-hidroxi-octanoato)
		Nonil	Poli(3-hidroxi-dodecanoato)
	2	Hidrogênio	Poli(4-hidroxi-butirato)
		Metil	Poli(4-hidroxi-valerato)
	3	Hidrogênio	Poli(5-hidroxi-valerato)
		Metil	Poli(5-hidroxi-hexanoato)
	4	Hexil	Poli(6-hidroxi-dodecanoato)

**Figura 2.3:** Representação genérica dos PHAs.

## 2.10 Aplicação dos poli(hidroxicanoatos)

A utilização de embalagens plásticas de difícil decomposição ao meio ambiente constitui um grande problema para a sociedade atual. Uma das propriedades dos PHAs é sua biodegradabilidade, fazendo com que, estes polímeros possam ser usados para a produção de embalagens comerciais. Além da utilização de PHAs na indústria de embalagens, a indústria farmacológica usa os PHAs como matéria-prima para a composição de cápsulas. Outra aplicação muito interessante dos PHAs é seu uso em engenharia tissular, para a fabricação de próteses e outros componentes médicos, em função da sua biocompatibilidade (WILLIAMS *et al.*, 1999), que não gera substâncias tóxicas durante a biodegradação. Na área médica, o alto custo de produção é compensado pelo alto valor agregado alcançado pelos produtos finais (ZINN *et al.*, 2001).

O PHB isolado dos microorganismos gram-negativos contém uma membrana de lipo-poli(sacarídeos) (LPS) que é uma endotoxina conhecida como pirogeno. A presença da (LPS) induz forte reação imunogênica e é, portanto, indesejável para aplicações biomédicas dos PHAs. As bactérias gram-positivas não apresentam a membrana LPS e são potencialmente melhores fontes de PHAs para uso em aplicações biomédicas (ROY *et al.*, 2007).

O (R)-3-ácido hidroxidobutírico ((R)-3-HB), um monômero do P(3HB), é conhecido por exibir atividade antimicrobiana, antiviral e inseticida. O (R)-3-HB é utilizado para a produção de antibiótico, vitaminas, aromáticos e feromônios. Há vários registros sobre o uso do P(3HB) em várias áreas da medicina (TOKIWA e UGWU, 2007).

O P(3HB) é mais duro e quebradiço do que os plásticos sintéticos, como o polipropileno. A incorporação de 3-hidroxivalerato à cadeia do polímero melhora a flexibilidade e diminui a temperatura de fusão ( $T_m$ ), criando um intervalo de temperaturas na qual o polímero pode ser processado sem ser degradado. Como a temperatura de transição vítrea também diminui, esse material pode ser usado em baixas temperaturas sem quebrar (KELLER *et al.*, 2008).

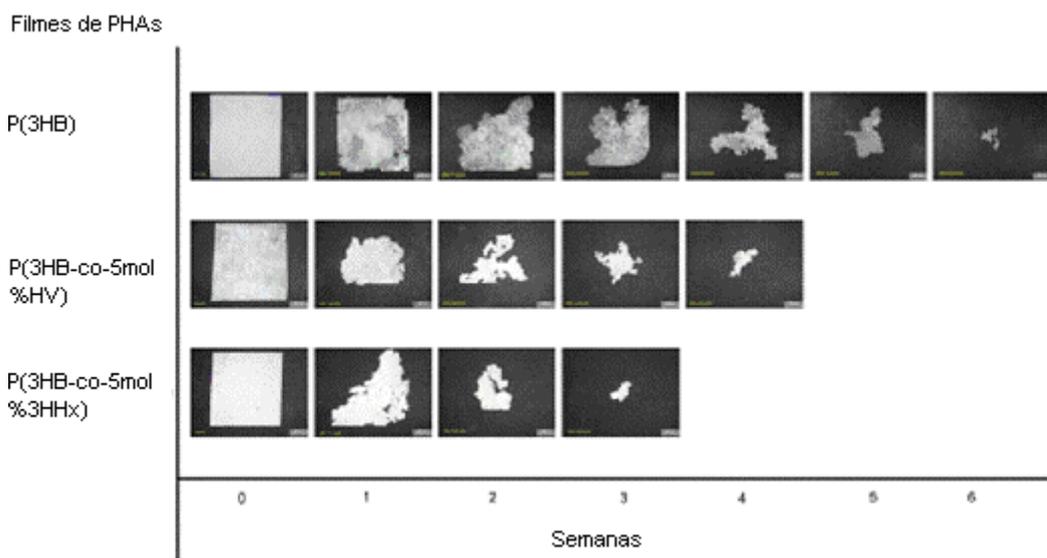
Estudos demonstram que os PHAs podem apresentar grupos funcionais de grande interesse, pois podem melhorar as propriedades de mcl-PHA e podem ser modificados por reações químicas para obter grupos mais úteis. Essa técnica pode aumentar o leque de aplicações do PHA como polímero ambientalmente biodegradável e como biomaterial para a biomedicina (RHEE *et al.*, 2000). Os PHAs certamente servirão como moldes para o desenvolvimento de outros polímeros biodegradáveis, produzidos quimicamente ou por técnicas biotecnológicas (STEINBÜCHEL e LÜTKE-EVERSLOH, 2002).

### **2.11 Biodegradação dos poli(hidroxicanoatos)**

A característica mais marcante dos PHAs é a biodegradabilidade. Na natureza diversos microrganismos podem degradar PHAs a  $CO_2$  e água pelo uso de PHA hidrolases e PHA depolimerases (ALMEIDA *et al.*, 2004). A decomposição dos P(3HB) é da ordem de poucos meses, quando submetido à digestão anaeróbica, e de alguns anos, quando lançado à água do mar (MADISON e HUISMAN, 1999). A Figura 2.4 apresenta um esquema gráfico sobre a biodegradação dos PHAs. Além da estrutura química dos polímeros, há outros fatores que também influenciam a velocidade de degradação, como a morfologia das peças e a cristalinidade do material (ROSA e CHUI, 2002).

A biodegradação dos biopolímeros pode ocorrer por dois mecanismos distintos, dependendo da natureza do polímero e do ambiente. O primeiro mecanismo é a hidrólise biótica ou abiótica, seguida por bioassimilação (hidrobiodegradação). Esse é o

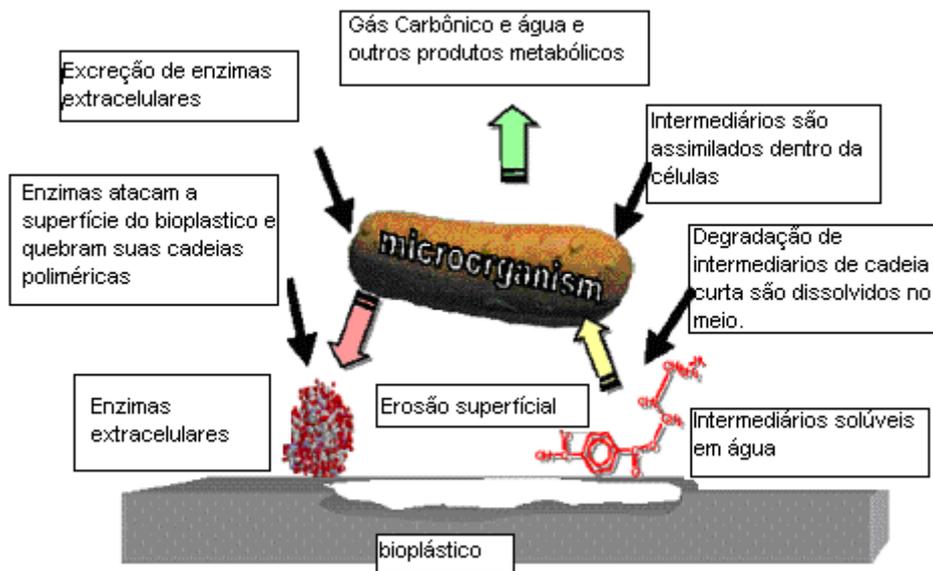
processo primário envolvido na biodegradação das heterocadeias poliméricas (tais como celulose, amido e poliésteres alifáticos), das quais os polímeros de ácidos láticos (PLA) e poli(hidroxicanoatos) (PHAs) são exemplos típicos. O segundo mecanismo é a peroxidação, seguida por bioassimilação de produtos de baixa massa molar (oxo-biodegradação). Esse processo é aplicado usualmente à cadeia de carbono dos polímeros (SCOTT, 2000).



**Figura 2.4:** Esquema gráfico da biodegradação de PHA, em leito aerado adaptado (SUDESH *et al.*, 2006).

Um grande número de artigos tem demonstrado que o P(3HB) pode ser degradado em condições aeróbicas, anaeróbicas e termofílicas (TOKIWA e UGWU, 2007). A capacidade para degradar o scl-PHA é amplamente distribuída entre as bactérias e fungos filamentosos, de maneira que várias despolimerases tenham sido purificadas e caracterizadas. Embora poucos artigos sobre a degradação de mcl-PHA têm sido documentados, apenas cinco depolimerase mcl-PHA têm sido purificadas e caracterizadas (SHIN *et al.*, 2005).

Os PHAs são degradados a água e dióxido de carbono em condições aeróbicas. Em condições anaeróbicas produz metano. A taxa de biodegradação é influenciada por vários fatores ambientais tal como população microbiana, temperatura, nível de umidade, pH, cristalinidade e área de superfície do PHA (SUDESH *et al.*, 2006). Na Figura 2.5, apresenta-se um esquema simplificado da ação de microorganismo sobre um material bioplástico.



**Figura 2.5:** Mecanismo de degradação de bioplásticos, adaptado de SUDESH *et al.*, 2006.

Durante a degradação, os polímeros são primeiro convertidos para seus monômeros. Dessa maneira, os monômeros podem atravessar a membrana celular e sofrer degradação dentro das células. A quebra da cadeia de polímero inicialmente pode resultar de vários fatores físicos e químicos. Forças físicas, tais como, calor ou frio, umidade, podem causar prejuízo à cadeia polimérica, tal como sua quebra. A despolimerização também pode ocorrer por ação enzimática; neste caso encontramos dois tipos de enzimas que envolvem a biodegradação biológica, as enzimas de despolimerase extracelulares e as intracelulares. Neste processo, a enzima inicialmente adsorve na parte hidrofóbica do PHA, iniciando, aí, o processo de hidrólise. A taxa de degradação enzimática dos filmes de P(3HB) diminui com o aumento da cristalinidade. Na Tabela 2.5 apresenta-se uma lista de microorganismos que degradam diferentes tipos de plásticos. Uma lista mais completa pode ser encontrada em SHAH *et al.*, (2008), onde podem, também, ser encontradas citações de vários artigos a respeito da degradação de polímeros e suas misturas.

O estudo da degradação dos PHAs não é importante apenas para o projeto de aterros sanitários. Existem estudos da degradação dos PHAs em diversas condições, como na água do mar, já que muitos materiais são jogados nos rios e oceanos. Outros estudos de extrema importância dizem respeito à degradação dos PHAs no organismo

animal. Sabe-se que os PHAs são degradados por um mecanismo de hidrólise química em valores de pH encontrados nas aplicações médicas (ENGELBERG e KOHN, 1991).

**Tabela 2.5** – Lista dos bioplásticos e microorganismos utilizados para sua degradação (SHAH *et al.*, 2008) .

<b>Bioplásticos</b>	<b>Microorganismos</b>
Poli(3-hidroxibutirato)	<i>Pseudomonas lemoigei</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Schlegelella</i> .
Poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)	<i>Clostridium botulium</i> , <i>Streptomyces sp.</i> <i>SNG9</i>
Policaprolactona	<i>Clostridium botulium</i> , <i>Fusarium solani</i>
Poli(ácido láctico)	<i>Bacillus brevis</i> , <i>Penicillium roquefort</i>

## 2.12 Dificuldades encontradas na produção de poli(hidroxicarboxilatos)

O principal obstáculo para a ampla aceitação dos PHAs é o elevado custo de produção, que é 10 vezes maior que o custo de produção de plásticos sintéticos. Estudos mostram que 40% dos gastos da produção são associados às fontes de carbonos e 27% à recuperação do biopolímero (CHOI e LEE, 1997). A viabilidade econômica da produção de P(3HB) depende da eficiência e velocidade de crescimento do microorganismo, da formação do produto e do conteúdo intracelular do biopolímero. Dessa forma, para viabilizar o processo de produção é preciso maximizar a conversão de carbono e a produtividade ao longo de todo o processo (ACKERMANN e BABEL, 1998). Assim, as formas adotadas para reduzir o custo de produção de PHA incluem o uso de substratos de baixos custos, a prospecção de novos microorganismos produtores e o emprego da engenharia metabólica e da engenharia genética.

As reações de polimerização que dão origem aos PHAs não são conhecidas com 100% de confiança. Apenas KAWAGUCHI e DOI (1992) propuseram um modelo para a polimerização enzimática que ocorre nas bactérias. STUBBE *et al.*, (2005) realizou uma abordagem similar, no entanto, com mais ênfase na identificação das unidades funcionais que compõem a polimerase. As duas abordagens admitem que o modelo

cinético é composto por uma reação de iniciação de cadeia, uma reação de propagação e uma reação de terminação por transferência de cadeia.

O custo da produção de P(3HB) reportado por LEE e CHOI (1997) foi de \$ 2,6/kg de P(3HB), enquanto YAMANE *et al.*, (1995) reportaram o custo de \$8,32/kg de P(3HB), estimado em 2002 por AKYAMA *et al.*, que o custo da produção de P(3HB) em uma escala de 100000 toneladas por ano como 2,6 US\$/kg, baseado nos melhores dados experimentais de produção de P(3HB) por *Alcaligenes latus*, já o custo de produção de 1 kg de polipropileno é em torno de US\$ 0,7 (ZINN *et al.*, 2001) Para a produção da mesma quantidade de P(3HB) por ano, o processo com baixa produtividade requer grandes equipamentos para a fermentação e recuperação. O alto conteúdo de P(3HB) torna os processos de recuperação mais econômicos, devido ao uso de menor quantidade de surfactante e hipoclorito na recuperação e devido ao menor custo do tratamento da água residual. Portanto, é importante empregar um processo de fermentação que resulte em alto conteúdo de P(3HB), para que o processo seja economicamente viável. Outro fator que dificulta a produção de P(3HB) é o mau cheiro durante a produção industrial (TOKIWA e UGWU, 2007). O mau cheiro é devido à degradação de material celular misturado ao polímero e impede o uso do material em grande número de aplicações.

### **2.13 Fontes alternativas de carbono**

Açúcares, tais como glicose e sacarose, são as fontes de carbono mais comumente usadas para a produção de PHA, porque podem ser obtidas a preços relativamente baixos (TSUGE, 2002). No entanto, PHAs podem ser produzidos a partir de uma ampla variedade de substratos, tais como fontes renováveis (amido, celulose), fósseis (metano, óleo mineral, lignina), subprodutos de outros processos (melaço, soro de queijo, glicerol), produtos químicos (ácido propiônico, ácido 4-hidroxibutírico) e dióxido de carbono. O dióxido de carbono é utilizado como fonte de carbono em cultivos de cianobactérias (ASADA *et al.*, 1999). A engenharia metabólica está sendo explorada para introduzir novas vias metabólicas e aumentar a diversidade de substratos utilizáveis, a fim de aumentar a produtividade da síntese e a produção de novos PHAs (REDDY *et al.*, 2003).

A bactéria *Ralstonia eutropha* pode usar CO<sub>2</sub> inorgânico como fonte de carbono. Isso está de acordo com as observações de Huges e Richardson em 1984, que

mostraram que a concentração de CO<sub>2</sub> no meio de cultivo afeta a biossíntese de P(3HB) (TANAKA *et al.*, 1995).

Os ácidos graxos voláteis (AGV), obtidos por digestão anaeróbica, são também precursores para formação de PHA. Fontes de AGV incluem resíduos municipais (KALIA e JOSHI, 1995).

Os resíduos agrícolas e da indústria de alimentos podem ser utilizados como fontes baratas de carbono e nitrogênio. Entre as fontes de carbonos estão a xilose, o segundo açúcar mais abundante nesses resíduos, o ácido láctico e o ácido acético (TSUGE *et al.*, 1999, TSUGE *et al.*, 2001), obtidos de fermentações anaeróbicas.

Muitos resíduos agroindustriais, como os óleos vegetais, têm sido utilizados como substratos na biossíntese de PHAs. Os óleos vegetais parecem ser substratos favoráveis, porque levam à produção de grandes quantidades de PHAs e, conseqüentemente, a menores custos de produção. Alguns estudos mostram que óleos vegetais podem aumentar o rendimento em PHAs, sendo que cada grama de óleo produz até 0,8 g de PHAs. Quando açúcar é utilizado, cada grama de açúcar produz apenas 0,3 g de PHA (SUDESH *et al.*, 2008).

Uma outra fonte de carbono alternativa que vem sendo estudada é o lodo ativado originado de plantas de tratamento de água. Este processo traz dois benefícios, em primeiro lugar, diminui o preço final do produto produzido; em segundo lugar, permite a redução de resíduos de lodos ativados (CHAKRABARTI *et al.*, 2007).

Muitas espécies de *Pseudomonas* têm a peculiaridade de sintetizar PHAs a partir de compostos orgânicos halogenados, aromáticos, olefinas e ésteres (RHEE *et al.*, 2000).

Os ácidos orgânicos também podem ser utilizados como fontes para a produção de PHAs, mas estes podem inibir o crescimento do microorganismo. Ácidos orgânicos podem conduzir ao colapso da trans-membrana, devido ao gradiente de pH nas células bacterianas, especialmente nas altas concentrações de ácidos (CHEN *et al.*, 2003).

Restos orgânicos, como restos de comida usualmente não podem ser utilizados diretamente por produtores de PHAs. Hidrólise e acidogênese dos resíduos brutos devem ser usados como são o primeiro passo para a produção de ácido orgânicos, como o ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico, que podem ser posteriormente utilizados por produtores de PHAs. Este meio fermentativo pode ser utilizado por *A. eutropha* para o crescimento e produção de PHA, mas são também tóxicos e inibem o crescimento do microorganismo, dependendo do pH. A toxicidade dos ácidos orgânicos é

atribuída às moléculas lipofílicas que penetram livremente na membrana das células, dissociando e acidificando o citoplasma. Como resultado, o gradiente de prótons através da membrana não pode ser mantido e a produção de energia é interrompida (YU *et al.*, 2001).

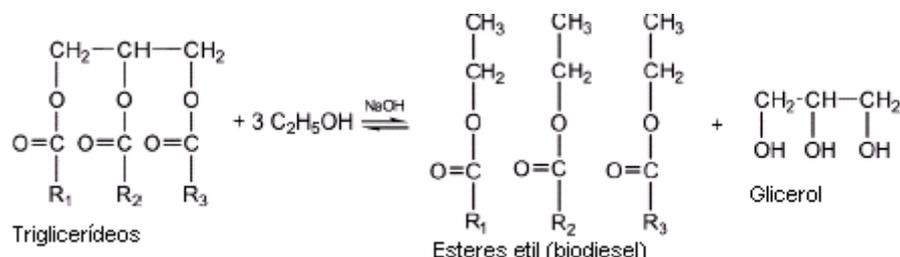
### 2.13.1 Glicerol

O glicerol (1,2,3 propanotriol) foi descoberto em 1779, por Scheele e observado na fermentação alcoólica por Pasteur em 1858 em concentração de 2,5 – 3,6% do conteúdo de etanol (SILVA *et al.*, 2009). O glicerol é um poliálcool de fórmula molecular  $[C_3H_5(OH)_3]$  que está presente no ambiente celular de diferentes espécies, incluindo protistas unicelulares e mamíferos. No entanto, é difícil encontrarmos o glicerol em sua forma “livre” nesses organismos, pois geralmente está presente como triglicerídeo combinado a ácidos graxos, como os ácidos: oléico e palmítico. O glicerol é um produto atóxico que pode ser utilizado em diversos setores industriais (SILVA *et al.*, 2009).

Dentre as características físico-químicas do glicerol, destacam-se as características de um líquido oleoso, incolor, viscoso e de sabor doce, solúvel em água e álcool em todas as proporções e pouco solúvel em éter. Na indústria alimentícia, o glicerol é usado como aditivo, em função de suas propriedades estabilizantes, antioxidantes, sequestrantes, emulsificantes e umectantes. Nos produtos farmacêuticos, sua aplicação é devida a sua alta viscosidade, o que permite sua utilização em xaropes. É considerado também um agente crioprotetor nos microorganismos, não permitindo a formação de cristais de gelo nas células. Também é empregado para a produção de resinas e poliésteres, devido a sua reatividade e polifuncionalidade. Na indústria têxtil, é usado como lubrificante (SILVA *et al.*, 2009).

A produção do glicerol inicialmente era realizada por saponificação de óleos e gorduras, para a produção de sabão. Atualmente esta técnica está em desuso, devido à substituição dos sabões por detergentes. O glicerol pode ser obtido a partir de derivados de petróleo por cloração a altas temperaturas, embora esta seja uma rota que gera subprodutos prejudiciais. Também é possível produzir glicerol através de processos fermentativos, usando-se vários microorganismos como: bactérias, leveduras, fungos e algas; contudo, o processo de recuperação do glicerol é difícil nesse processo. Finalmente, o glicerol é um subproduto da produção do biodiesel, produzido

aproximadamente na proporção de 9% em massa em relação ao biodiesel. O biodiesel é produzido a partir de óleos vegetais e gorduras animais, através de uma reação de transesterificação com etanol ou metanol, geralmente catalisada por hidróxido de sódio (NaOH) ou hidróxido de potássio (KOH) (Figura 2.6) (SILVA *et al.*, 2007).



**Figura 2.6:** Reação de transesterificação para a produção do biodiesel adaptado (SILVA *et al.*, 2009).

O biodiesel é um importante substituto dos combustíveis fósseis e pode ser produzido a partir de recursos renováveis. O biodiesel é menos poluente, já que o gás carbônico liberado na queima pode ser assimilado pelas plantas para produzir biodiesel. Na literatura podem ser encontrados diversos estudos sobre a produção de biodiesel, através da rota metílica. O metanol é um inconveniente, devido a sua toxicidade, que acaba tornando os resíduos tóxicos para usos posteriores. Além disso, esta rota não gera um ciclo auto-sustentável, pois o metanol geralmente é obtido de fontes fósseis. Por isso, a rota etílica vem sendo desenvolvida (GAMBETTA., 2006).

Se a produção de biodiesel for alavancada, em um futuro próximo o glicerol também passará a ser uma commodity e, muito provavelmente, experimentará grande redução do preço. Atualmente, a União Européia é líder na produção de biodiesel, com uma parcela de 82% da produção mundial. O Brasil tem condições favoráveis para se tornar o maior produtor de biodiesel. Em primeiro lugar, o uso de álcool como combustível para carros tem uma longa tradição na cultura brasileira. Como segunda vantagem, as condições para o cultivo de plantas oleaginosas são extremamente favoráveis em muitas áreas do país (SILVA *et al.*, 2009).

O glicerol está presente na natureza e muitos organismos conhecidos podem usar unicamente o glicerol como fonte de carbono e energia (SILVA *et al.*, 2009). Esses microorganismos têm atraído a atenção pelo potencial de usar o glicerol abundante da produção de biodiesel, para a produção de produtos de maior valor agregado. Sendo assim, o glicerol constitui uma promessa de nova fonte de carbono abundante para a

indústria microbiológica. Nesse contexto, é importante dizer que GAMBETTA (2006) observou que o açúcar podia ser parcialmente substituído por glicerol durante a produção de PHAs por *Bacillus sp.* Dessa forma, parece adequado avaliar se o glicerol pode constituir uma fonte de carbono alternativa para a produção de PHAs.

#### **2.14 Comentários Finais**

Há muitos estudos disponíveis sobre PHAs, em virtudes das propriedades vantajosas de biodegradabilidade e biocompatibilidade desses materiais. No entanto, o uso comercial dos PHAs é fortemente inibido pelos altos custos de produção. Uma possível solução para este problema é o uso de fontes alternativas de carbono mais baratas, como o glicerol. O uso do glicerol é incentivado por resultados preliminares obtidos por GAMBETTA (2006), que indicam que microorganismos podem crescer e produzir PHAs a partir do glicerol.

## **Capítulo 3**

### **Materiais e Métodos**

Neste capítulo são apresentados os materiais e os métodos utilizados durante o presente trabalho, utilizando como substrato o glicerol. As fermentações foram realizadas em uma primeira etapa em frascos agitados. Com estes experimentos, analisou-se o crescimento característico do microorganismo em diferentes meios e condições. Em frascos agitados foi ainda utilizada a glicerina fornecida diretamente por indústrias de biodiesel como fonte de carbono. A análise em biorreator foi feita em uma segunda etapa. Foram realizadas medidas de substrato consumido, de concentração celular e de acúmulo de PHA. O caldo celular obtido em biorreatores foi utilizado para a extração de PHA e sua posterior análise.

#### **3.1 Materiais e metodologia**

##### **3.1.1 Reagentes**

Os reagentes utilizados ao longo dos experimentos foram adquiridos junto a VETEC QUIMICA FINA LTDA., com exceção do padrão de poli(3-hidroxi-butarato) que foi adquirido junto a SIGMA-ALDRICH. Todos os materiais foram adquiridos com grau analítico (PA).

##### **3.1.2 Microorganismo**

Foi utilizada a bactéria *Bacillus sp.*. A cultura foi mantida em glicerol (20%) a -20°C em freezer. A bactéria foi obtida de um meio de cultura, utilizado por GAMBETTA (2006), mantida no laboratório de Bioprocesso do Programa de Engenharia Química da COPPE.

#### **3.2 Meios de cultura**

Os meios de cultura utilizados foram:

**Para plaqueamento:** Agar nutriente ( $\text{g.L}^{-1}$ ): Extrato de carne, 3,0; Peptona de carne, 5,0; Agar, 15,0.

**Para reativação celular** Caldo nutriente ( $\text{g.L}^{-1}$ ): Extrato de carne, 3,0; Peptona de carne, 5,0.

#### **Meio Mínimo:**

Na Tabela 3.1 são listados os componentes presentes no meio de cultivo utilizado para o crescimento do microorganismo. Este meio de cultivo foi desenvolvido com base no trabalho de WANG e LEE (1997).

**Tabela 3.1-** Composição do meio de cultivo.

<b>Componentes</b>	<b>Composição</b>
Sulfato de amônio	3 $\text{g.L}^{-1}$
Acido cítrico monohidratado	0,1 $\text{g.L}^{-1}$
Fosfato de sódio dibásico anidro	3,57 $\text{g.L}^{-1}$
Fosfato de potássio monobásico	1,5 $\text{g.L}^{-1}$
Sulfato ferroso	0,05 $\text{g.L}^{-1}$
Cloreto de cálcio dihidratado	0,01 $\text{g.L}^{-1}$
Glicerol	20 $\text{g.L}^{-1}$
Sulfato de Magnésio heptahidratado	0,2 $\text{g.L}^{-1}$

O meio de cultivo também é composto por uma solução de microelementos, sendo adicionado 1  $\text{mL.L}^{-1}$  da solução de microelementos ao meio de cultivo, composta pelas substâncias relacionadas na Tabela 3.2:

#### **3.2.1 Meio para reativação celular e armazenamento do microorganismo**

Preparou-se um meio para reativação celular com 5  $\text{g.L}^{-1}$  de peptona de carne e 3  $\text{g.L}^{-1}$  de extrato de carne.

Foram preparados 200 mL de meio em um erlenmeyer de capacidade de 500mL. O erlenmeyer foi autoclavado a temperatura de 121°C por 20 minutos. Numa câmara de fluxo contínuo foram inoculados 10 mL ou (5%) de um meio líquido contendo o microorganismo. Colocou-se o recipiente sob agitação de 170 rpm e temperatura de 30°C para que ocorresse a proliferação das células por 20 horas. Este meio foi também utilizado para fazer o estoque de células a serem utilizadas nas próximas fermentações.

Em uma câmara de fluxo contínuo, as células foram armazenadas em tubos. Foi preparada uma solução contendo 40% de glicerol em volume. 1 mL dessa solução foi adicionada a cada tubo junto com 1 mL do meio de reativação preparado anteriormente os tubos foram armazenados em um freezer a -20°C.

**Tabela 3.2 - Composição da solução de microelementos.**

<b>Componentes</b>	<b>Composição (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	300
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	200
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	300
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	30
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> . 4H <sub>2</sub> O	30
NiSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	30
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	10

### **3.3 Preparação do pré-inóculo**

Os tubos preparados como descrito na seção 3.2.1 são reativados a cada fermentação. Em um erlenmeyer de 500 ml, uma solução de meio mínimo com um volume de trabalho de 200 mL era inoculada assepticamente com um tubo com 2 mL de células. O erlenmeyer era posto em um agitador rotatório com temperatura controlada em 30°C e agitação de 170 rpm por 8 horas, (equivalente à fase exponencial alcançada pelas células).

### **3.4 Cultivo Celular em frascos agitados utilizando glicerol**

Prepararam-se 200 mL do meio de cultivo em um erlenmeyer de 500 mL de capacidade. Este foi inoculado com 2 mL de dispersão celular de *Bacillus sp.* armazenadas em glicerol. O erlenmeyer foi vedado e posto em um agitador orbital Nova Ética (MOD. 430) com controle de agitação e temperatura, sendo estas mantidas em 170 rpm e 30 °C, respectivamente. Este frasco foi mantido nestas condições por 14 horas. Deste meio foi retirado 5% para inocular outro meio de cultivo preparado posteriormente, seguindo o mesmo procedimento apresentado. O experimento foi realizado em duplicata. Este experimento teve por finalidade avaliar o crescimento do

microorganismo, medindo-se a absorvância de amostras retiradas em intervalos de 2 horas no comprimento de onda de 600 nm. O zero foi calibrado com água.

### **3.5 Cultivo em Biorreator**

Os cultivos foram realizados em um biorreator modelo Biostat B (B. Braun), com vaso de 2 L, utilizando um volume de trabalho de 1 L de meio de cultivo mínimo, como apresentado na seção 3.2. O biorreator possui sensor de pH e de oxigênio dissolvido, que foram utilizados para controlar o processo.

O ar alimentado ao biorreator era pré-filtrado (para remoção de particulados) e depois era passado por um filtro de membrana (0,2  $\mu\text{m}$  PTFE) (esterilizado em autoclave junto com vaso do biorreator), para manter a corrente de ar isenta de contaminação.

O vaso do biorreator era esterilizado seguindo os passos descritos a seguir. O eletrodo de pH era calibrado utilizando padrões de pH 4,00 e 7,00, segundo os procedimentos definidos no manual do equipamento. O eletrodo era então encaixado ao vaso do biorreator. A solução usada para controlar o pH era uma solução de hidróxido de sódio 2 M. Quando a reação no biorreator começou a ser realizada em batelada alimentada, outras soluções foram testadas. Após a calibração e fixação do eletrodo de pH e dos recipientes que continham a solução para controlar o pH, era adicionada a solução do meio mínimo ao vaso do biorreator sem as soluções de nutrientes. O meio era composto apenas de água destilada e glicerol, com a finalidade de manter os eletrodos imerso em solução para que não fossem danificados durante o processo de esterilização. A tampa do vaso do biorreator, os sensores de temperatura, o eletrodo de oxigênio dissolvido, o condensador, a mangueira para entrada de ar e o filtro de membrana eram então colocados em seus respectivos encaixes. Após a montagem do sistema, o biorreator era levado à autoclave para esterilização por 20 minutos a 121 °C. Após o tempo de esterilização e resfriamento, o sistema era conectado à torre de controle através dos cabos dos eletrodos e o sistema era mantido em repouso para a polarização do eletrodo de oxigênio por um intervalo de 6 horas, segundo o manual do equipamento.

Com o biorreator foi possível medir o pH, o oxigênio dissolvido, a velocidade de agitação, a temperatura e ainda manter essas variáveis nos valores estipulados no início do experimento. Para o controle de temperatura, o vaso do biorreator é composto por

uma camisa de resfriamento/aquecimento. Através da alimentação de água fria ou aquecida, a temperatura foi mantida a 30°C. A velocidade de agitação do biorreator foi controlada por um controlador cascata e foi limitada a 1/3 da máxima velocidade nominal do reator, por questão de segurança. Depois do período de polarização do eletrodo de oxigênio dissolvido, foi realizada a calibração do eletrodo com ar (100%) e nitrogênio (0%) como sugerido pelo o manual. A produção de espuma durante o processo de fermentação foi controlado com a adição de óleo mineral.

As soluções de alimentação foram preparadas, fixando-se a razão molar entre carbono e nitrogênio. O glicerol possui massa molar igual a 92 g.mol<sup>-1</sup>, enquanto o hidróxido de amônio utilizado possui massa molar 35 g.mol<sup>-1</sup>. A razão molar entre carbono e nitrogênio pode ser calculada utilizando a Equação 3.1.

$$R = \frac{\text{Carbono}}{\text{Nitrogênio}} = \frac{\frac{\text{massa2}}{92} \times 3}{\frac{\text{massa1}}{35} \times 1} \quad 3.1$$

onde *massa1* representa a massa de hidróxido de amônio e *massa2* represente a massa de glicerol .

### 3.6 Efeito da concentração de glicerol

Testes para avaliar a influência da concentração de glicerol sobre o crescimento da *Bacillus sp* foram realizados. Foram preparados cinco frascos contendo o meio mínimo, variando a concentração de glicerol adicionada a cada um deles. A Tabela 3.3 mostra a concentração de glicerol utilizada em cada frasco

**Tabela 3.3 - Influência da concentração de glicerol.**

Frasco	Concentração de glicerol (g.L <sup>-1</sup> )
1	10
2	20
3	50
4	100
5	150

### 3.7 Avaliação da concentração de glicerol e nitrogênio

Para realizar estes experimentos foi construído um plano experimental a 3 níveis. As quantidades de nitrogênio e glicerol utilizados estão reportadas na Tabela 3.4. Estas seis concentrações foram combinadas entre si, conforme mostrada na Tabela 3.5.

**Tabela 3.4** – Concentrações do sal de sulfato de amônio e glicerol utilizados nos meios fermentativos.

	2	3	4
Nitrogênio (g.L <sup>-1</sup> )			
Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	5	20	35

Para a execução destes experimentos, foram preparados 9 frascos contendo o meio estudado. Os frascos foram nomeados como mostrada na 1º coluna da Tabela 3.5 e os frascos 1A, 3A, 2B, 1C e 3C foram realizados em duplicatas para avaliação dos erros experimentais.

**Tabela 3.5** – Experimentos realizados com diferentes concentrações de sulfato de amônio e o glicerol.

Experimento	Nitrogênio (g.L <sup>-1</sup> )	Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )
1A	2	5
2A	2	20
3A	2	35
1B	3	5
2B	3	20
3B	3	35
1C	4	5
2C	4	20
3C	4	35

### 3.8 Cultivo celular em frascos agitados utilizando sacarose

Com o intuito de estabelecer uma comparação entre dois substratos, realizou-se um cultivo do microorganismo usando 20g.L<sup>-1</sup> de sacarose, ao invés de glicerol.

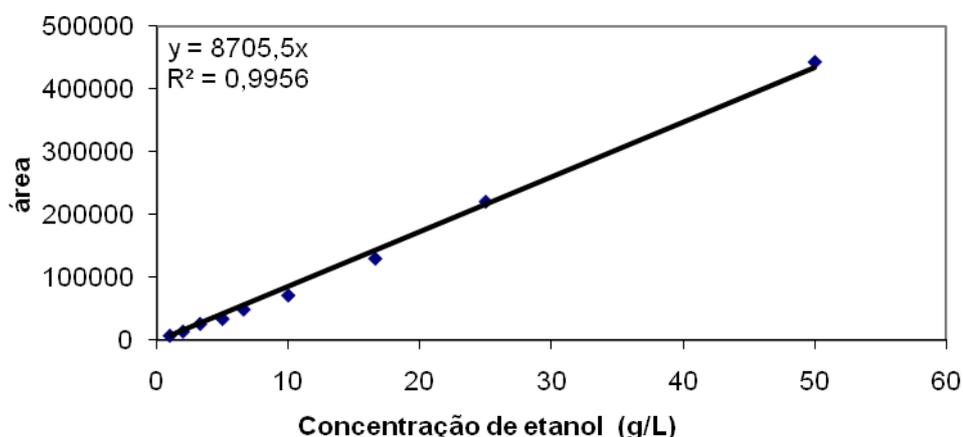
### 3.9 Aeração

Prepararam-se três meios de cultivo, sendo um utilizado para a reativação dos microorganismos armazenados. Após o período de incubação para o crescimento bacteriana, foram inoculados 5% em cada um dos outros dois meios restantes em uma

câmara de fluxo contínuo. Um dos meios foi mantido em um erlenmeyer de 500 mL de capacidade e o outro foi adicionado a um erlenmeyer de 1000 mL. O volume de meio usado em cada erlenmeyer era o mesmo, ou seja, 200 mL, tendo estes a mesma composição.

### 3.10 Curva de calibração do etanol

Utilizando-se um cromatógrafo a gás, foi construída uma curva de calibração. Preparou-se uma solução de  $100\text{g.L}^{-1}$  de etanol e com esta solução prepararam-se outras soluções diluídas de 1 a 100 vezes. As diluições foram realizadas em triplicata. Após o preparo, cada solução foi injetada no cromatógrafo e sua área de integração foi anotada. As injeções no cromatógrafo foram realizadas em triplicata. Com os valores médios das três áreas e a concentração de cada solução preparada, construiu-se o gráfico apresentado na Figura 3.1.



**Figura 3.1:** Curva de calibração para o etanol por cromatografia gasosa.

As análises foram conduzidas em um cromatógrafo a gás modelo 37, marca Instrumento Científico C.G., usando uma coluna aço inox de 1,5 m x 1/8". Cada injeção continha um volume de solução de  $5\ \mu\text{L}$ .

A temperatura da coluna, a temperatura do injetor e a temperatura do detector foram mantidas a  $120\ ^\circ\text{C}$ ,  $160\ ^\circ\text{C}$  e  $235\ ^\circ\text{C}$  respectivamente. A vazão de nitrogênio e de ar do gás de arraste foram mantidas iguais a  $35\ \text{mL.min}^{-1}$  e  $300\ \text{mL.min}^{-1}$  respectivamente.

### **3.11 Gravimetria para a determinação de massa seca de células**

Para realizar a análise gravimétrica foram coletadas amostras de 25 mL após o final da fermentação. As medidas foram realizadas em triplicata. Colocaram-se 25 mL do meio fermentado em um frasco. Este foi centrifugado por 10 minutos a 10000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com água destilada. Novamente, os recipientes foram centrifugados nas mesmas condições descritas acima. Após o processo de centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram novamente lavados com água destilada, seguindo novamente os procedimentos acima. O precipitado foi re-suspendido, utilizando-se água destilada, e acondicionado em cadinhos.

A preparação dos cadinhos foi feita como descrita a seguir. Foram utilizados três cadinhos, que foram identificados e postos na estufa a 80°C, para que a umidade fosse vaporizada. As massas dos cadinhos foram monitoradas com uma balança de quatro casas decimais até massa constante. Utilizou-se um dessecador para transportar os cadinhos até a balança. Quando estes atingiram a massa constante, os valores foram anotados, e os precipitados re-suspendidos foram adicionados aos cadinhos e levados à estufa na condição já comentada. As massas foram monitoradas novamente até atingirem valores constantes. De posse da massa e do volume calculava-se a concentração.

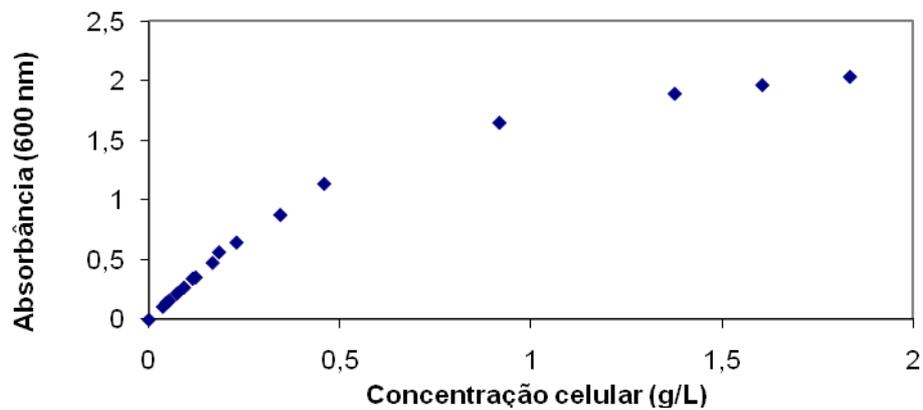
### **3.12 Calibração espectrofotométrica de massa celular**

Uma porção do meio fermentado foi utilizada para fazer várias diluições, como apresentado na Tabela 3.6. A concentração de célula era conhecida como determinada no item 3.11.

As absorvâncias de cada uma dessas soluções foram medidas em um espectrômetro UVmini 1240, marca Shimadzu, no comprimento de onda de 600 nm. Conhecendo-se a diluição, calcularam-se as concentrações em  $\text{g.L}^{-1}$  de célula seca e construiu-se a Figura 3.2, que relaciona a absorvância pela concentração de células.

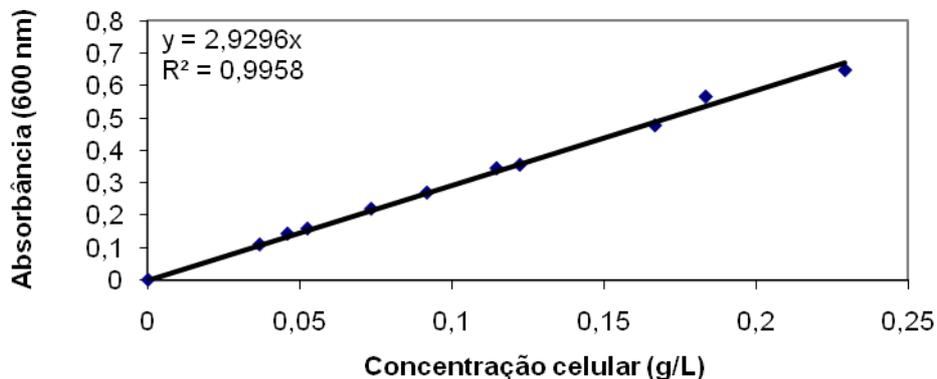
**Tabela 3.6** – Diluição do meio fermentado.

Experimento	Volume de meio fermentado (mL)	Volume de água destilada (mL)
1	4	0
2	3,5	0,5
3	3	1
4	2	2
5	1	3
6	0,75	3,25
7	0,5	3,5
8	0,25	3,75
9	0,1	3,9



**Figura 3.2:** Curva de correlação entre a concentração celular de *Bacillus sp.* e a absorbância do meio em 600 nm.

Utilizando a faixa linear apresentada na Figura 3.2 obteve-se a Figura 3.3 com a equação da reta que representa a absorbância como função da concentração celular.

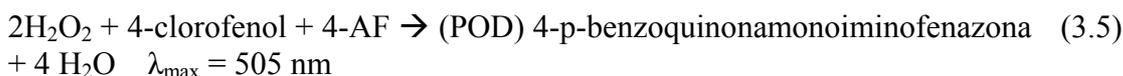
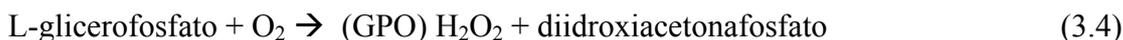
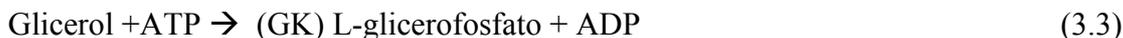
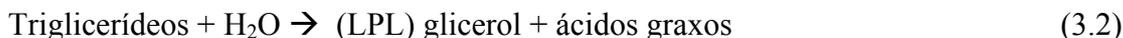


**Figura 3.3:** Correlação linear entre a concentração celular e a absorbância do meio.

### 3.13 Curva de calibração para o glicerol

O consumo de glicerol foi verificado durante o período de fermentação, utilizando um kit enzimático para triglicerídeos. O método pressupõe que as reações descritas nas Equações (3.2 – 3.5) ocorrem.

Fundamento do método



Onde GK representa a enzima glucoquinase, GPO representa a enzima fosfato de glicerol oxidase e POD representa a enzima Peroxidase

Como no meio fermentativo não há triglicerídeos, a reação (3.2) não é realizada. O método começa então a partir da reação (3.3). No kit estão presentes os seguintes reativos listados: padrão; 5 ml de solução estabilizada de glicerol equivalente a 200 mg.dL<sup>-1</sup> (2,29mmol.L<sup>-1</sup>) de trioleína (que não será utilizada no experimento); tampão, 100 ml de tampão PIPES, pH 6,5; enzimas, 02 frascos contendo enzimas / ATP/ 4-aminofenazona e ingredientes não reativos.

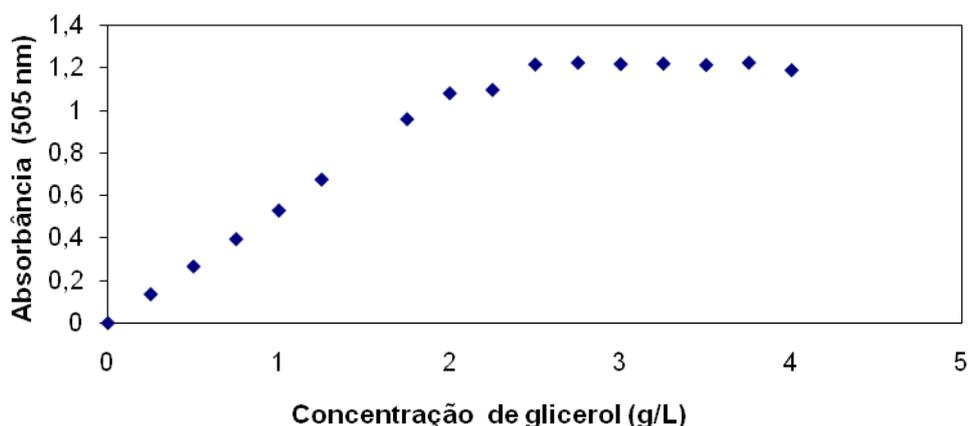
Inicialmente, deve-se reconstituir um frasco de enzimas com 50 ml de tampão, misturando por inversão suave, evitando a formação de espuma. Este reativo é estável

por 10 dias, quando armazenado entre 2 – 8°C, e 2 dias a 20-28°C. Em tubos de ensaios foram colocados os volumes definidos na Tabela 3.7. Os volumes foram misturados e incubados a 37°C por 10 minutos. Foram realizadas as leituras de absorbância das amostras em espectrofotômetro a 505 nm, sendo o tubo B o branco, P o padrão e D o tubo da amostra a analisar. A reação é estável por até 60 minutos.

**Tabela 3.7 – Preparo das amostras para análise de glicerol.**

<b>Tubos</b>	<b>B</b>	<b>P</b>	<b>D</b>
<b>Amostra</b>	-	-	10 µL
<b>Padrão 1</b>	-	10 µL	-
<b>Reativo</b>	1 mL	1 mL	1 mL

Seguindo este procedimento e utilizando soluções de glicerol com concentração conhecida, foram construídas duas curvas de calibração. Figura 3.4 mostra a primeira curva de calibração. Esta curva apresenta uma faixa em que a leitura é linear e uma faixa onde a leitura é não-linear. A partir do ponto 9 a curva começa a ficar não-linear, neste ponto encontra uma concentração de 2,2 g.L<sup>-1</sup> de glicerol, não sendo aconselhado uso de concentrações maiores do que essa.



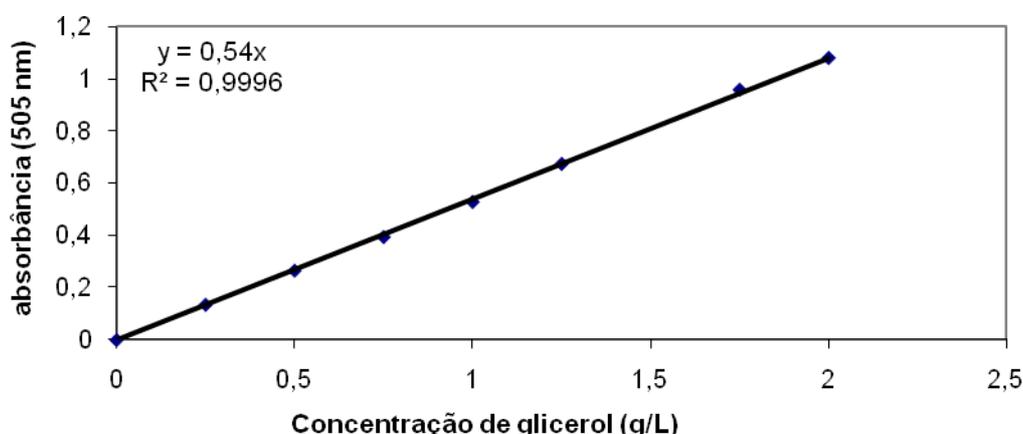
**Figura 3.4:** Curva de calibração para o glicerol por espectrofotometria com comprimento de onda de 505 nm.

Com a faixa linear apresentada na Figura 3.4 obteve-se a Figura 3.5 e a equação correspondente da faixa linear. Esta curva foi utilizada para verificar o consumo de glicerol das amostras coletadas durante o processo fermentativo.

As amostras coletadas foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi guardado para analisar o consumo de glicerol. Este sobrenadante foi diluído em água destilada, para que a concentração final de glicerol estivesse dentro da faixa linear. Com a ajuda de um vortex, a solução foi agitada para uma perfeita mistura e dessa solução resultante, 10 µL foram utilizadas para a análise de glicerol.

### 3.14 Estudo do Processo de fermentação utilizando glicerina.

Com o objetivo de avaliar o crescimento celular da *Bacillus sp.*, utilizando como fonte de carbono o glicerol residual fornecido por uma usina de biodiesel, foi realizado cultivo substituindo o glicerol PA. O experimento foi realizado, utilizando o meio já descrito em frascos agitados.



**Figura 3.5:** Equação da curva de calibração para o glicerol por espectrofotometria com comprimento de onda de 505 nm na região linear.

A glicerina consiste de uma mistura de glicerol com outros componentes derivados do processo de produção do biodiesel. A glicerina fornecida por plantas de biodiesel. Possui grandes quantidades de sais e bases utilizadas durante o processo. Por isso, a glicerina é alcalina e apresenta pH de 10,5.

O meio com glicerina possui uma cor branca leitosa que dificulta a leitura em espectrofotômetro. Por isso, foi feito um tratamento da glicerina. Vários tratamentos

foram testados, mas os melhores resultados foram obtidos com um processo de filtração. O meio com glicerina era preparado e colocado em shaker, com as condições de agitação e temperatura iguais a 170 rpm a 30°C, respectivamente, durante 24 horas. Ao fim do processo, a solução era filtrada por ação da gravidade. Esta solução foi autoclavada e inoculada com o pré-inóculo.

### **3.15 Determinação de Poli-hidroxibutirato**

BRAUNEGG *et al* (1978) desenvolveram uma metodologia para a determinação e quantificação do biopolímero produzido. Esta metodologia desenvolvida envolve a reação de transesterificação de uma amostra de células, obtida diretamente do cultivo. A forma aqui utilizada segue algumas modificações propostas por RIIS e MAI (1988).

Entre 24 e 48 horas de cultivo, alíquotas de 25 mL foram retiradas do meio e centrifugadas a 10000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi dispensando. O precipitado foi lavado com água destilada e centrifugado nas mesmas condições descritas acima. O procedimento de lavagem foi realizado duas vezes, obtendo-se ao final um precipitado. O precipitado era armazenado em um freezer a -20°C, para que as amostras fossem analisadas todas ao mesmo tempo.

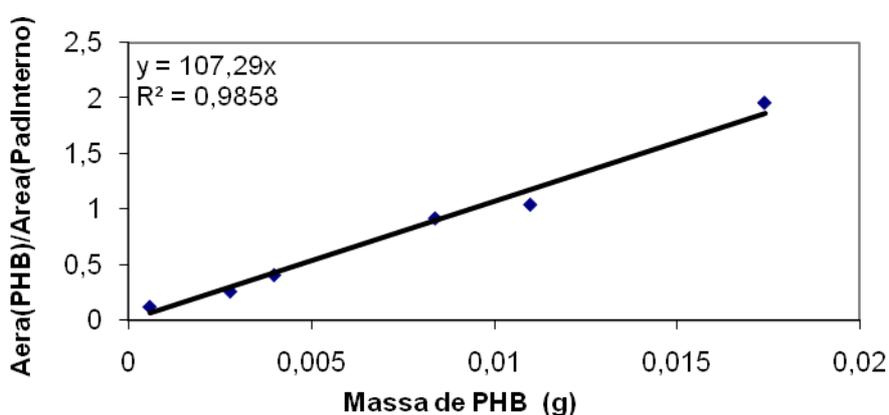
Após o recolhimento das amostras ao longo do período de fermentação, estas foram secadas em estufa a vácuo a temperatura de 40 °C por 24 horas. As amostras secas foram colocadas em tubos selados e a esse material foram adicionados 2 mL de 1,2-dicloro-etano, 2 mL de propanol acidificado (1 volume de ácido clorídrico concentrado e 4 volumes de 1-propanol) e 200 µL da solução de padrão interno (2 g de ácido benzóico em 50 mL de 1-propanol). As misturas resultantes foram mantidas em banho a 100 °C durante duas horas, com agitações de 30 em 30 min. Ao final desse tempo, as misturas foram esfriadas até a temperatura ambiente. Adicionaram-se então 4 mL de água destilada, com o intuito de separar a fase orgânica. Esta mistura foi agitada em um vortex por 30 s e deixada em repouso para a separação das fases. Com uma pipeta de Pasteur, a fase orgânica, que continha o polímero, foi removida e injetada em um cromatógrafo para obter o cromatograma.

Na metodologia é necessário construir uma curva de calibração, correlacionando-se a áreas obtidas com massas padrões de PHB, fornecido pela SIGMA-ALDRICH. Esta curva padrão foi construída utilizando massas de PHB iguais a (0,6; 2,8; 4; 8,4; 11; 17,4; 21; e 29,9 mg). A quantidade de biopolímeros presente em

cada amostra é dada em função da relação entre as áreas dos picos do polímero e do padrão interno, que posteriormente são comparadas à curva de calibração, onde quantidades conhecidas de biopolímeros passaram pelo mesmo procedimento.

As análises de cromatografia gasosa foram realizadas em um cromatógrafo CP 9000 (Chrompack), equipado com um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna Restek Stabilwax (coluna de sílica fundida com 30 m de comprimentos, 0,32 mm de diâmetro interno e 1  $\mu\text{m}$  de espessura de filmes), cuja fase estacionária era constituída de Carbowax-PEG entrecruzado. As temperaturas de operação do forno, do injetor e do medidor foram programadas da seguinte forma: a) Forno – uma rampa de 120  $^{\circ}\text{C}$  a 190  $^{\circ}\text{C}$  ( $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ), seguido de temperatura constante em 190  $^{\circ}\text{C}$  por um minuto; b) injetor – constante e igual a 250  $^{\circ}\text{C}$ ; c) detector – constante e igual a 250  $^{\circ}\text{C}$ . O equipamento operou com uma vazão do gás de arraste (hélio) de  $2,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , vazão de splitt de  $2,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , vazão de hidrogênio de  $30\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , vazão de ar de  $300\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e vazão de make-up de  $30\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (nitrogênio). Com uma micro-seringa injetaram-se  $0,15\text{ }\mu\text{L}$  da fase orgânica no cromatógrafo.

A aquisição de dados e a integração dos picos foram realizadas, empregando-se um módulo Star 800 MI (Varian) ligado a um computador que utiliza o software Star Chromatography Workstation (Star Toolbar v. 6,20, Varian), com uma frequência de aquisição de 50 Hz. Na Figura 3.6 é possível observar os resultados obtidos da propanólise, empregando-se o polímero disponível.



**Figura 3.6:** Curva de calibração para o PHB por cromatografia gasosa.

### 3.16 Curva de calibração para o nitrogênio

Com o objetivo de determinar a quantidade de nitrogênio consumido durante o processo fermentativo, uma metodologia foi estudada e empregada. O método é conhecido como método fenol hipoclorito, desenvolvido por WEATHERBIRN (1967). Para aplicar o método, é necessário preparar dois reagentes, o reagente A e B; reagente A, mistura de fenol e nitroprussiato de sódio em água; para preparar 500 mL de solução do reagente A são necessários 5 g de fenol, 25 mg de nitroprussiato de sódio, usar água sem amônia (água mili-Q)

Obs.: O nitroprussiato de sódio é difícil de solubilizar em água.

O reagente B é a mistura de hidróxido de sódio e hipoclorito de sódio em água. Para preparar 500 mL de solução são necessários: 2,5 g de hidróxido de sódio, 4,2 mL de hipoclorito de sódio, usar água deionizada. As soluções com os reagentes A e B devem ser conservadas em frascos de âmbar em geladeira por 1 mês. Para análise do nitrogênio, em um tubo de ensaio com 20  $\mu$ L de amostra ou solução de sulfato de amônio, devem-se adicionar 5 mL do reagente A. Depois, devem ser adicionados 5 mL do reagente B. O tubo deve ser tampado, homogeneizado e deixado em banho Maria a 37°C por 20 minutos. Finalmente, deve-se ler a absorvância em 625 nm. De acordo com esse método, a amostra deve conter de 0,025 a 0,3 g.L<sup>-1</sup> de amônio.

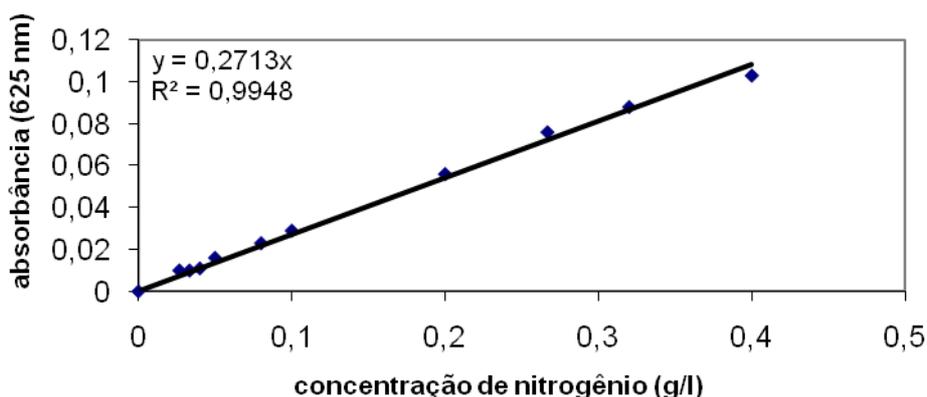
Preparou-se uma curva de calibração com uma solução padrão de sulfato de amônio e diluições. A curva de calibração da concentração de nitrogênio é apresentada na Figura 3.7. Através de regressão linear dos dados coletados, obteve-se a equação da reta que foi utilizada durante a fermentação para o monitoramento do nitrogênio.

### 3.17 Extração do Poli(hidroxicanoato)

A técnica de digestão de PHA por hipoclorito de sódio foi descrita pela primeira vez em 1963 por pesquisadores da universidade de Syracuse (WU *et al.*, 2007). De acordo com esse método, três fases são obtidas: uma fase superior (sobrenadante) de solução de hipoclorito de sódio; uma fase intermediária contendo materiais celulares, e uma fase mais densa onde se encontram o clorofórmio e o P(3HB). O polímero é recuperado por precipitação em um solvente (metanol ou etanol) e posterior filtração. A utilização desse método mostra que a degradação do polímero pode ser

significativamente reduzida, uma vez que o clorofórmio dissolve o P(3HB) liberado pelo hipoclorito de sódio (WU *et al.*, 2007).

O processo original consiste inicialmente na liofilização da massa de células, colhida por centrifugação. Durante esse trabalho a extração do biopolímero foi realizada sem o processo de liofilização. Pesou-se uma quantidade de células úmidas (1 g) em um erlenmeyer de 500 mL, adicionando-se 50 mL de clorofórmio, 30 mL de hipoclorito de sódio e 20 mL de água destilada. Este sistema era colocado no agitador orbital, nas condições de agitação e temperatura de 100 rpm e 38°C, respectivamente, por uma hora. Com uma pipeta, retirava-se a solução do fundo do recipiente, que era adicionada a um béquer. Para cada 10 mL dessa solução, adicionavam-se 50 mL de etanol. O sistema era mantido em repouso em capela para a evaporação da mistura, restando no fundo do recipiente um sólido branco, coletado para análise.



**Figura 3.7:** Curva de calibração para análise do nitrogênio por espectrofotometria com comprimento de onda de 625 nm.

### 3.18 Métodos utilizados para a caracterização do biopolímero produzido

Um dos objetivos desse trabalho é avaliar o tipo de poli(hidroxialcanoato) produzido, utilizando o microorganismo *Bacillus sp.* e glicerol como fonte de carbono. Já foi comentado no Capítulo 1 que o microorganismo e o tipo da fonte de carbono influenciam na formação do biopolímero. Por isso, diferentes técnicas foram empregadas para possibilitar a caracterização do material obtido. Uma amostra padrão foi utilizada para comparar com os resultados obtidos.

### **3.18.1 Análise de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)**

Cada deslocamento químico apresentado em um espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  pode ser relacionado a um determinado tipo de átomo de carbono presente na estrutura do biopolímero.

Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  foram obtidos utilizando tetracloreto de etano como solvente. A quantidade de amostra empregada foi de 120 mg para 2,5 mL de solvente. As amostras foram acondicionadas em um tubo de ensaio apropriado para realizar análise de RMN. Estas análises foram realizadas no Instituto de Macromoléculas Eloísa Mano da UFRJ. O equipamento utilizado foi Varian Mercury modelo VX 300 com campo de 7.05 tesla.

### **3.18.2 Comportamento térmico**

Os resultados são analisados em forma de curvas, que contêm a informação a respeito da variação do parâmetro medido como uma função da temperatura, durante o aquecimento ou o resfriamento

#### **3.18.2.1 Análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC)**

Após a extração do biopolímero obtidos durante o cultivo foi realizada à análise térmica de DSC. A técnica de DSC permite avaliar as transições térmicas do polímero, que ocorrem durante o processo de aquecimento e/ou resfriamento em uma determinada faixa de temperatura.

A variação da entalpia em função do tempo ( $dH/dt$ ) é o parâmetro medido durante a análise calorimetria diferencial de varredura (DSC). A técnica fornece informações a respeito do fluxo de calor no compartimento da amostra em função da variação da temperatura ou do tempo (a T constante). Neste caso, o instrumento empregado é um calorímetro, DSC, e o transdutor ou sensor é uma resistência de platina (LUCAS *et al.*, 2001).

O equipamento consiste de duas câmaras com capacidades caloríficas similares, que são aquecidas a uma velocidade específica. O material a ser investigado é colocado em uma das câmaras e na outra, é colocado um padrão termicamente inerte. O calor específico diferencial do material pode ser determinado a partir das variações de temperatura entre as duas câmaras. Nas reações químicas ou transformações físicas

(fusão ou cristalização) medimos a absorção ou liberação de calor, que são detectadas pelo equipamento.

A temperatura de transição vítrea, denotada  $T_{g,,}$ , é definida como a temperatura que separa o comportamento sólido do comportamento líquido em um sólido amorfo como o vidro.

As seguintes condições de análise foram utilizadas. Utilizou-se uma massa de amostra de aproximadamente 10 mg, a faixa de temperatura para verificação do comportamento da amostra era de -25 a 190°C, velocidade de aquecimento era de 10°C.min<sup>-1</sup>, a velocidade do primeiro resfriamento foi de 190°C.min<sup>-1</sup> e a velocidade do segundo resfriamento foi de 10°C.min<sup>-1</sup>

Todas as amostras sofreram dois ciclos de aquecimento. No primeiro, a amostra foi aquecida a 190°C a uma taxa de 10°C.min<sup>-1</sup> e resfriada a 190°C.min<sup>-1</sup> (quenching). No segundo ciclo, a amostra foi aquecida de -25°C a 190°C a uma taxa de 10°C.min<sup>-1</sup> e resfriada nesta mesma razão, com registro dos dados. Com o tratamento térmico dado às amostras, foram determinadas as temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ), de fusão ( $T_m$ ), de cristalização no aquecimento ( $T_{ch}$ ) e no resfriamento ( $T_{cc}$ ), as entalpias de cristalização no aquecimento e no resfriamento ( $\Delta H_{ch}$  e  $\Delta H_{cc}$ , respectivamente) e a entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ). Através da técnica de DSC foi possível também estimar o grau de cristalinidade das amostras, dado pela razão entre a entalpia de fusão da amostra ( $\Delta H_m$ ) e a entalpia de fusão do P(3HB) completamente cristalino ( $\Delta H_m^o = 146$  J/g) (OLIVEIRA, 2004). O grau de cristalinidade é dado pela Equação 3.6.

$$X_c = \frac{\Delta H_m \times 100}{\Delta H_m^o} \quad 3.6$$

### 3.19 Microscopia eletrônica do microorganismo estudado

As amostras contendo células do microorganismo foram lavadas em PBS três vezes, fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M overnight a 4°C, lavadas com o mesmo tampão três vezes de 10 minutos, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, lavadas com o mesmo tampão três vezes de 10 minutos e desidratadas em série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e duas vezes 100%, 10 minutos). As amostras foram incluídas em resina epóxi (PolyBed 812, Polysciences) e polimerizada por 72 h a 60°C. As amostras foram cortadas no

ultramicrotomo Leica EM UC6 e recolhidos em grades de cobre de 300 mesh. Os cortes foram contrastados em acetato de uranila por 30 minutos e citrato de chumbo por 3 minutos. As observações foram realizadas no microscópio FEI Morgagni operando a 80 kV.

### 3.20 Identificação da bactéria

A identificação molecular foi realizada utilizando seqüenciamento e análise filogenética de fragmentos do gene RNA ribossomal 16S. A metodologia consistiu na amplificação do gene RNA ribossomal 16S pela metodologia de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente da amostra. Os *primers* (Oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram p27f e p1401r, homólogos às extremidades conservadas do gene RNA ribossomal 16S de bactérias. O produto amplificado foi purificado e submetido diretamente ao sequenciamento usando o seqüenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare). Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram p10f, 765f, 782r e p1100r.

As seqüências parciais do gene RNA ribossomal 16S obtidas com os diferentes *primers* foram montadas em um *conting* (seqüência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparada com as seqüências de organismos representados nas bases de dados do Genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e do RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Foram então selecionadas seqüências de organismos relacionados ao organismo desconhecido para a realização das análises filogenéticas. As seqüências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 2.0. A matriz de distancia evolutiva foi calculada de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining*, com calores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens, utilizando o software incluído no programa MEGA 2.0. As análises da amostras do microorganismo foram realizadas no Laboratório do PQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisa Químicas, Biológicas e Agrícolas), na Unicamp.

## Capítulo 4

### Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados os principais resultados experimentais obtidos ao longo desse trabalho. São apresentados dados relacionados ao crescimento do microorganismo em frasco agitado e biorreator. É feito o estudo de alguns parâmetros da fermentação e são apresentados resultados para as fermentações realizadas com glicerina. As análises dos PHAs produzido e extraído das células são também mostradas.

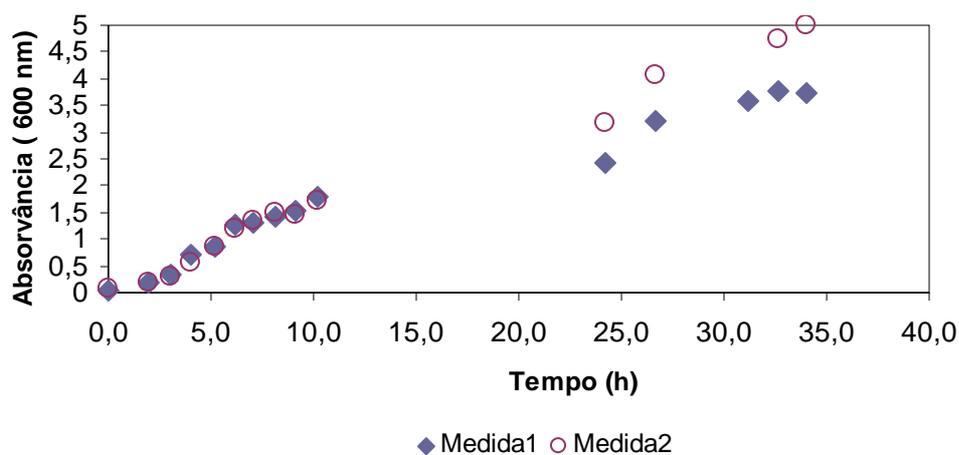
#### 4.1 Cinética de crescimento em frasco agitado

Com o objetivo de conhecer a curva de crescimento característico do microorganismo em diferentes condições, os primeiros experimentos foram realizados em frascos agitados, com a densidade ótica (DO) monitorada. Um exemplo típico é mostrado na Figura 4.1. O experimento foi realizado em duplicata. O crescimento celular no início do experimento nos dois frascos é aproximadamente o mesmo, entretanto, após um período de 25 horas, verifica-se uma diferenciação em relação aos dois cultivos. Isso se deve provavelmente ao fato de ser difícil controlar o sistema de forma idêntica por um período de tempo muito grande. Apesar disso, a reprodutibilidade pode ser considerada boa.

A partir dos tempos e das medidas de concentração de biomassa, foi possível calcular as taxas específicas de crescimento ( $\mu$ ) por regressão linear na forma:

$$\ln(A) = \mu t + \ln(A_0) \quad 4.1$$

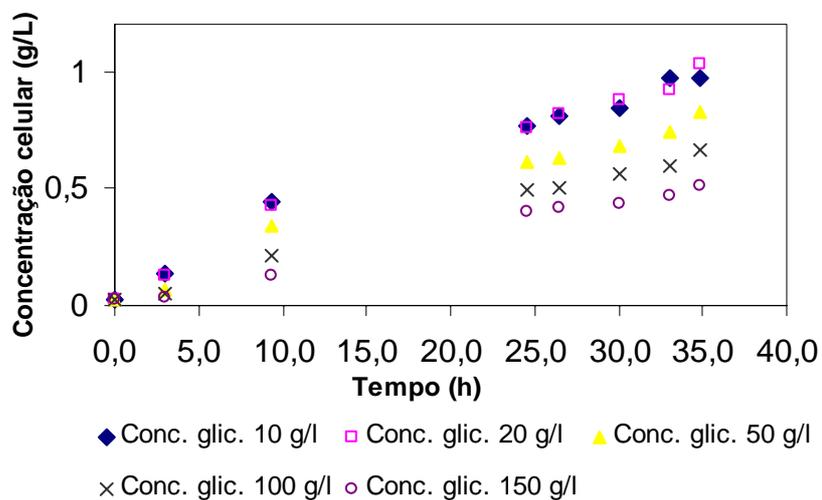
obtendo-se o valor  $\mu = 0,519 \text{ h}^{-1}$  para a Medida1 e  $0,4858 \text{ h}^{-1}$  para a Medida2, ilustrado na Figura 4.1, sendo assim, o microorganismo é capaz de crescer em um meio contendo glicerol, embora o crescimento pareça inibido devido à diminuição de  $\mu(t)$ . Esse efeito estar ligado a fatores como: produção de um metabólico pelo microorganismo no meio de cultivo que causa a inibição, mudança no valor do pH ou falta de algum nutriente essencial. Outros cultivos realizados em frascos agitados levaram a resultados similares.



**Figura 4.1:** Curva de crescimento característico de *Bacillus sp.*, em meio mínimo com concentração inicial de glicerol de 20 g/L mantido a 170 rpm e 30 °C.

#### 4.2 Perfis dinâmicos de concentração de células para diferentes concentrações iniciais de glicerol

Para avaliar se a adição de glicerol pode prejudicar o crescimento do microorganismo, uma serie de experimentos de cultivo com diferentes concentrações iniciais de glicerol foi proposta e os resultados são apresentados na Figura 4.2.



**Figura 4.2:** Influência da concentração de glicerol sobre o crescimento de *Bacillus sp.* realizada sobre as condições de 170 rpm e 30 °C.

Com os dados coletados é possível calcular as taxas específicas de crescimento para cada caso, como descrito na Equação 4.1 e usando apenas os 3 primeiros valores

experimentais por estarem no segmento exponencial da curva de crescimento. A Tabela 4.1 mostra as taxas específicas de crescimento para cada concentração.

**Tabela 4.1** – Resultado do efeito da concentração de glicerol na taxa específica de crescimento.

Concentração (g/L)	Taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) ( $h^{-1}$ )
10	0,2798
20	0,2712
50	0,2728
100	0,2228
150	0,1873

Parece claro que a concentração elevada de glicerol produz um efeito inibitório sobre o crescimento das células. O efeito é mais intenso quando a concentração de glicerol supera o valor de 50  $g.L^{-1}$ .

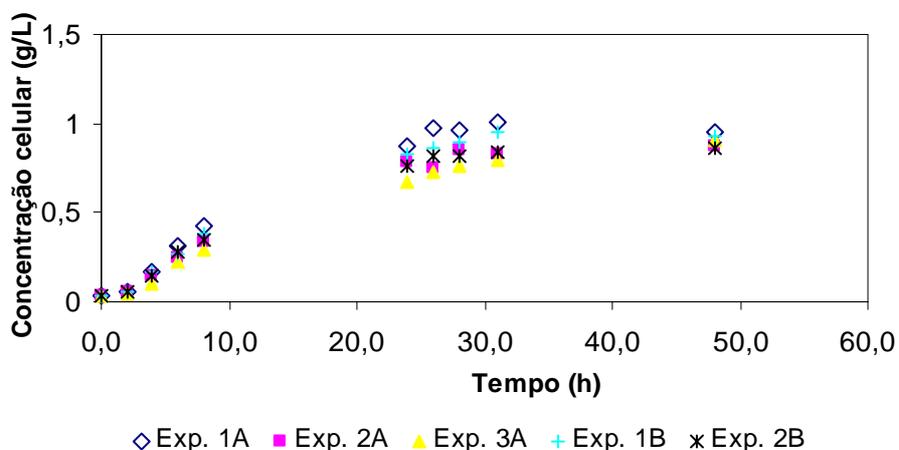
### **4.3 Avaliação do efeito da concentração de glicerol e nitrogênio sobre o crescimento**

Pode-se observar através dos 11 experimentos realizados com diferentes concentrações de sulfato de amônio e glicerol a semelhança entre os resultados obtidos, como mostrado na Figura 4.3. Todos os experimentos foram realizados sob as condições controladas de agitação e temperatura iguais 170 rpm e a 30°C, respectivamente.

Os resultados obtidos não apresentam diferenças significativas. Isto é bem evidenciado nas 10 primeiras horas de fermentação. Após 25 horas, observa-se uma pequena diferenciação entre os resultados, atribuída à dinâmica e as flutuações naturais do processo.

Os cultivos representados pela letra A contêm 2  $g.L^{-1}$  de sulfato de amônio enquanto nos cultivos 1A, 2A e 3A a concentração de glicerol é respectivamente igual a 5, 20 e 35  $g.L^{-1}$ . Os cultivos representados pela letra B contêm 3  $g.L^{-1}$  de sulfato de amônio, enquanto nos cultivos 1B e 2B a concentração de glicerol é igual a 5 e 20  $g.L^{-1}$  respectivamente. Apesar das diferenças serem pouco significativas, deve-se observar

que os resultados obtidos no cultivo 3A são sistematicamente inferiores aos demais, indicando novamente o efeito inibitório do glicerol.



**Figura 4.3:** Efeito de nitrogênio e glicerol sob o crescimento do microorganismo. Os cultivos representados por letras iguais têm a mesma concentração de sulfato de amônio.

Com os dados coletados é possível calcular as taxas específicas de crescimento para cada caso como descrito na Equação 4.1 e usando apenas os 5 primeiros valores experimentais. A Tabela 4.2 mostra o valor da taxa específica para cada experimento.

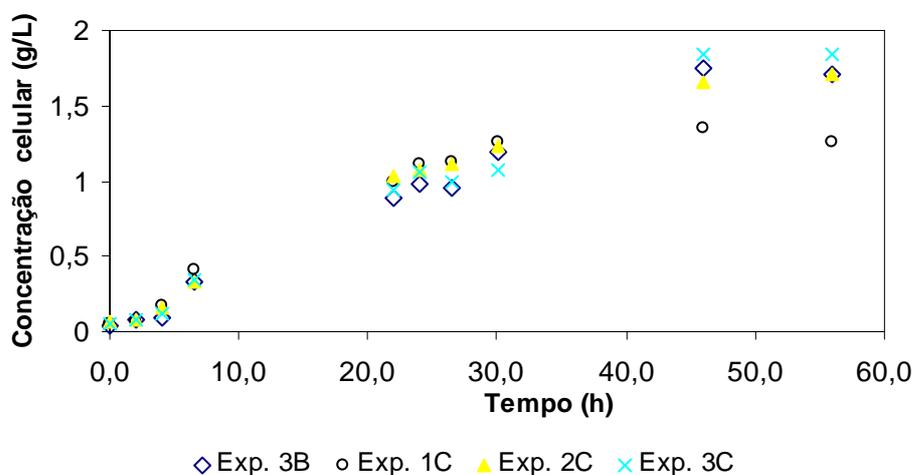
**Tabela 4.2** – Efeito da concentração de nitrogênio e glicerol sobre a taxa específica de crescimento no primeiro lote de experimentos.

Experimento	Taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) ( $h^{-1}$ )
1A	0,3388
2A	0,3027
3A	0,2940
1B	0,3144
2B	0,3163

A Tabela 4.2 confirma que a concentração elevada de glicerol produz um efeito inibitório sobre o crescimento das células, havendo redução consistente da taxa específica. com o aumento da concentração de glicerol.

Os demais experimentos realizados são reportados na Figura 4.4. O comportamento observado nos diferentes frascos também é similar aos demais. Como

na Figura 4.3, uma discrepância maior entre os dados é visível após 45 horas, como já comentado em parágrafos anteriores.



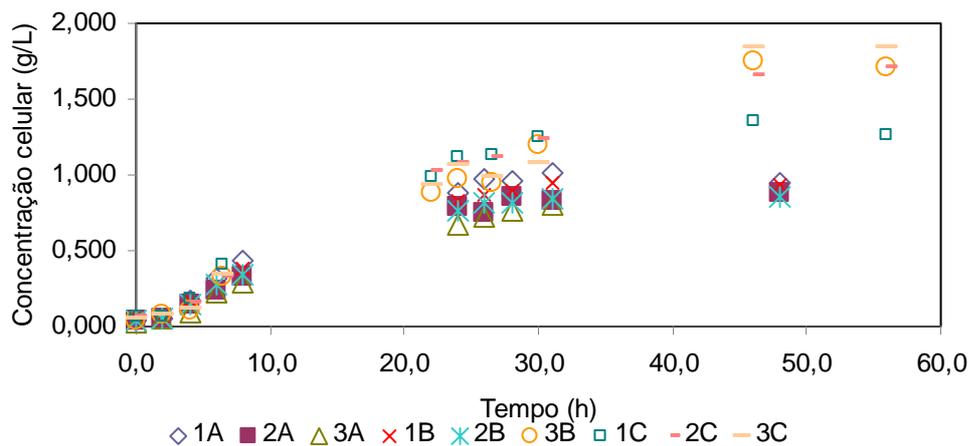
**Figura 4.4:** Efeito de nitrogênio e glicerol sobre o crescimento do microorganismo. Os cultivos representados por letras iguais têm a mesma concentração de sulfato de amônio.

Com os dados coletados é possível calcular as taxas específicas de crescimento para cada caso como descrito na Equação 4.1 e usando apenas os 4 primeiros pontos experimentais. A Tabela 4.3 mostra o valor da taxa específica para cada experimento.

**Tabela 4.3 –** Efeito da concentração de nitrogênio e glicerol sobre a taxa específica de crescimento no segundo lote de experimentos.

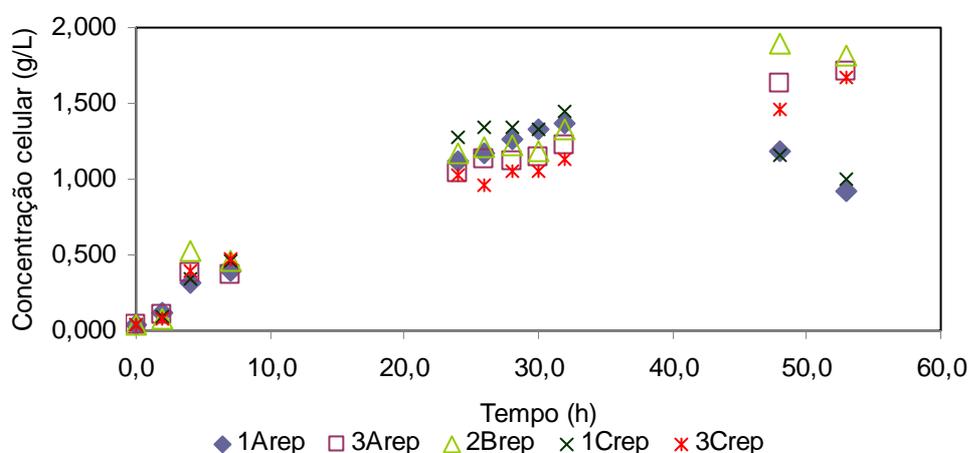
Experimento	Taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) ( $h^{-1}$ )
3B	0,2872
1C	0,3130
2C	0,2653
3C	0,2867

Observa-se, uma vez mais, que a alta concentração de glicerol produz um efeito inibitório sobre o crescimento das células. Quando os experimentos são analisados em conjunto, observa-se também que a alta concentração de nitrogênio pode ser prejudicial ao crescimento das bactérias. A Figura 4.5 mostra o conjunto completo de experimentos, onde esse efeito fica mais claro.



**Figura 4.5:** Efeito de nitrogênio e glicerol sobre o crescimento do microorganismo. Os cultivos representados por letras iguais têm a mesma concentração de sulfato de amônio de todos os cultivos.

Na Figura 4.6 estão representadas as réplicas dos pontos externos e do ponto central. No começo dos cultivos elas são aproximadamente iguais. À medida que o tempo passa é verificada uma variação sobre a resposta de cultivo.



**Figura 4.6:** Efeito de nitrogênio e glicerol sobre o crescimento do microorganismo. Os cultivos representados por letras iguais têm a mesma concentração de sulfato de amônio das réplicas.

Na Tabela 4.4 apresentamos as taxas de crescimento específico para as réplicas, realizadas sob as condições de 30°C e 170 rpm respectivamente. Como já comentado em outras parte desse trabalho, a taxa inicial de crescimento é semelhante mesmo em condições diferentes. A diferenciação nos cultivos realizados aqui é bem acentuada depois de 20 horas de cultivo e pode-se observar que, à medida que o tempo avança, a diferenciação entre as curvas de crescimento vão diferenciando. Vários fatores podem

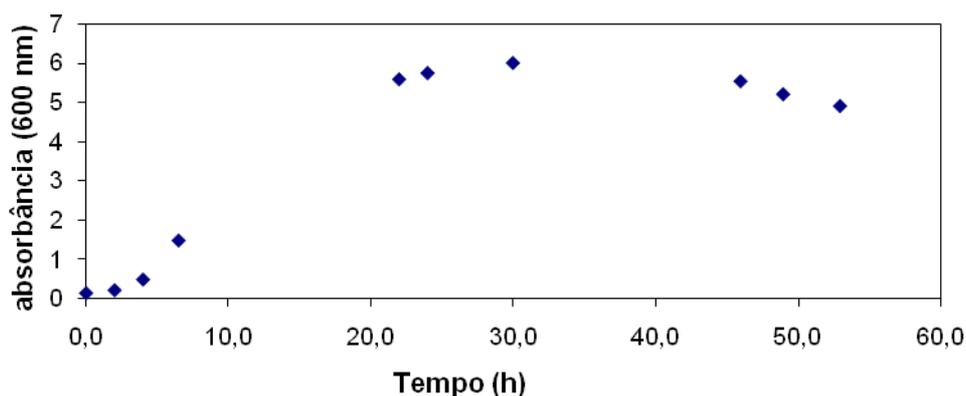
ocasionar este fato, sendo um sistema biológico e este possui uma dinâmica grande em relação aos resultados, fatores como contaminação também pode modificar o comportamento das curvas.

**Tabela 4.4** – Efeito da concentração de nitrogênio e glicerol sobre a taxa específica de crescimento das réplicas.

Experimento	Taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) ( $\text{h}^{-1}$ )
1Arep	0,3234
3Arep	0,3184
2Brep	0,3861
1Crep	0,3714
3Crep	0,3920

#### 4.4 Cultivo celular em frascos agitados utilizando sacarose

O microorganismo é capaz de crescer em sacarose, como pode ser observado na Figura 4.7. A taxa inicial de crescimento específico alcançado foi de  $0,44 \text{ h}^{-1}$ , sendo este valor equivalente aos encontrados nos cultivos que utilizaram o glicerol como substrato.



**Figura 4.7:** Cultivo em frasco agitado utilizando sacarose como substrato, para *Bacillus sp.* na temperatura e agitação de  $30^{\circ}\text{C}$  e 170 rpm, respectivamente.

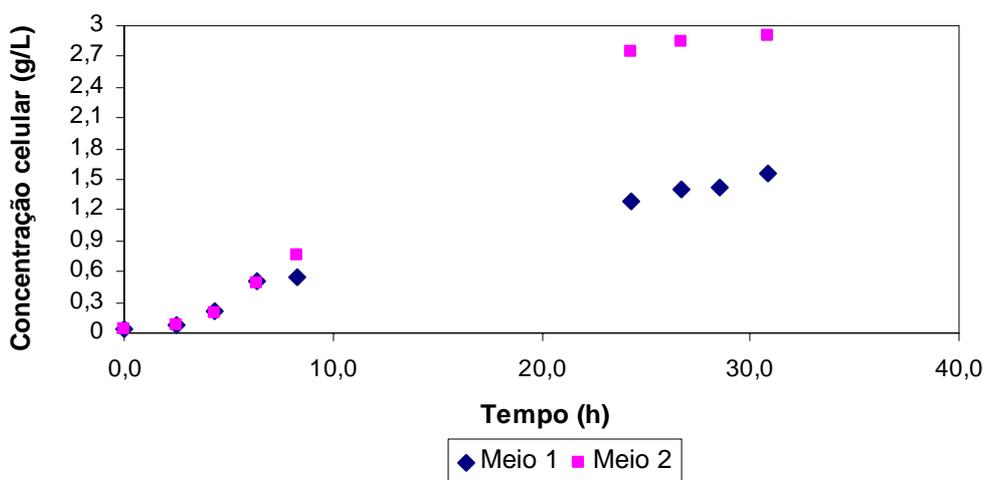
No entanto, pode-se observar que, após 20 horas de cultivo, atinge-se uma concentração de  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de células, que é aproximadamente igual ao dobro do valor alcançado nos cultivos com glicerol. Isso mostra que o microorganismo não é capaz de

usar o glicerol de forma eficiente para crescer, como no caso da sacarose. Apesar disso, os valores máximos de concentração celular são semelhantes nos dois casos, embora obtidos para tempos mais longos no glicerol. O efeito inibitório da sacarose não foi avaliado, por não constituir objetivo do trabalho.

#### 4.5 Efeito do fator aeração sobre o crescimento do microorganismo

O experimento foi realizado sobre as condições de agitação e temperatura de 170 rpm e a 30 °C respectivamente. O Meio 1 e o Meio 2 foram cultivados em recipientes de 500 e 1000 mL, mantendo o volume de trabalho de 200 mL. Na Figura 4.8 estão reportados os resultados obtidos.

O comportamento do cultivo realizado em dois meios similares, sob condições diferentes de aeração, pode ser bastante diferente. O Meio 2, realizado em condições de aeração mais favoráveis, resultou em expressivo aumento da concentração celular. Portanto, parece claro que esse fator deve ser controlado durante as comparações.



**Figura 4.8:** Avaliação da aeração sobre o crescimento celular, para *Bacillus sp.* na temperatura e agitação de 30°C e 170 rpm, respectivamente.

Como se sabe do ponto de vista bioquímico, o oxigênio é o último elemento a aceitar elétrons, ao final da cadeia respiratória, sendo então reduzido à água, permitindo que ocorra a reoxidação das coenzimas que participam das reações de desidrogenação (ao longo da glicólise e do ciclo de Krebs) e, ainda, permitindo o armazenamento de energia através da passagem das moléculas de ADP para ATP. Estas últimas, por sua vez, irão participar necessariamente nas reações de síntese de moléculas, para a sobrevivência das células e para o surgimento de novas células, no processo de

proliferação da biomassa microbiana, para as quais é fundamental a introdução de energia. Portanto, a limitação de oxigênio pode inibir o crescimento celular.

Sempre é possível dissolver quantidades significativas das fontes de carbono, nitrogênio, fósforo e demais nutrientes no meio de cultivo. No caso do oxigênio, no entanto, essa situação é bastante diferente, pois este elemento é muito pouco solúvel em água, (em torno de  $7 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$  (7ppm)), ao se borbulhar ar atmosférico à pressão de 1 atm e a  $35^\circ\text{C}$ .

Conclui-se, portanto, que de nada adiantaria dissolver centenas de gramas de fonte de carbono por litro, além das quantidades necessárias dos demais nutrientes, para que se imaginasse efetuar um processo fermentativo descontínuo aeróbio, sem que se imaginasse igualmente introduzir, ao longo do processo, o oxigênio necessário para suportar a condição de aerobiose, tendo em vista a baixíssima capacidade de armazenar o  $\text{O}_2$  em solução.

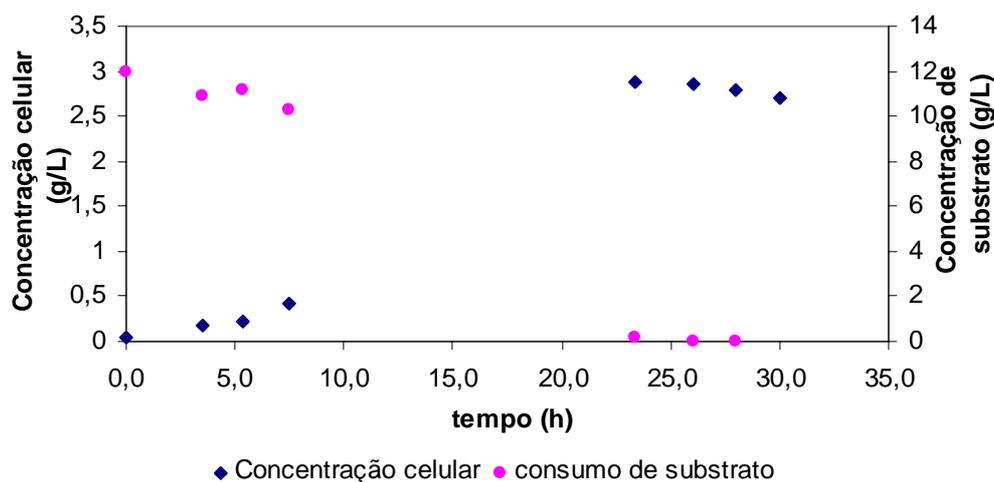
Exatamente por essa razão é que se costuma afirmar que a extensão de um processo descontínuo aeróbio e, por conseguinte, a obtenção de elevadas concentrações do produto desejado, depende enormemente da capacidade de se transferir o  $\text{O}_2$  para a fase líquida, especialmente nos instantes mais avançados do processo, onde a concentração celular pode ser elevada. O gráfico apresentado mostra esta diferenciação do crescimento das células no momento mais avançado do processo. Os resultados dos cultivos realizados em frascos parecem indicar que o crescimento microbiano é limitado por disponibilidade de oxigênio.

#### **4.6 Avaliação de produção de etanol pelo microorganismo**

Ao fim das fermentações, foram retiradas alíquotas do meio fermentado. O meio foi centrifugado e sobrenadante foi filtrado em uma membrana milipore. O líquido resultante foi injetado no cromatógrafo para a verificação de produção de etanol. Não foi verificada a presença de etanol nas amostras estudadas. Portanto, é possível dizer que o microorganismo não produz etanol durante o crescimento em glicerol nas condições estudadas.

#### 4.7 Consumo de substrato pelo microorganismo

A Figura 4.9 mostra o consumo de glicerol durante uma fermentação. Pode-se observar que glicerol é consumido durante o crescimento do microorganismo. É importante observar que o rendimento obtido é de ordem de 0,25 g de células por grama de glicerol consumido no meio.



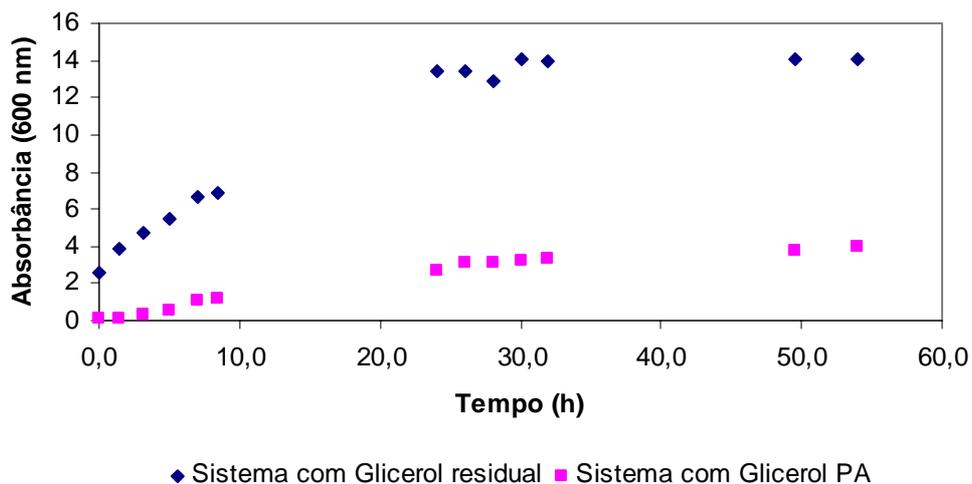
**Figura 4.9:** Consumo de glicerol durante o cultivo em biorreator batelada com temperatura em 30°, com oxigênio dissolvido de 20% e pH 7,0.

#### 4.8 Estudo sobre o pH do meio de cultivo.

O pH inicial do meio é igual a 7. O pH final do processo fermentativo variava na faixa de 6,5 a 4,5. Portanto, a fermentação desloca o equilíbrio para regiões ácidas, devido ao consumo de íons amônio é provável produção de resíduos ácidos. Assim, o pH do meio deve ser controlado durante as fermentações conduzidas em biorreatores.

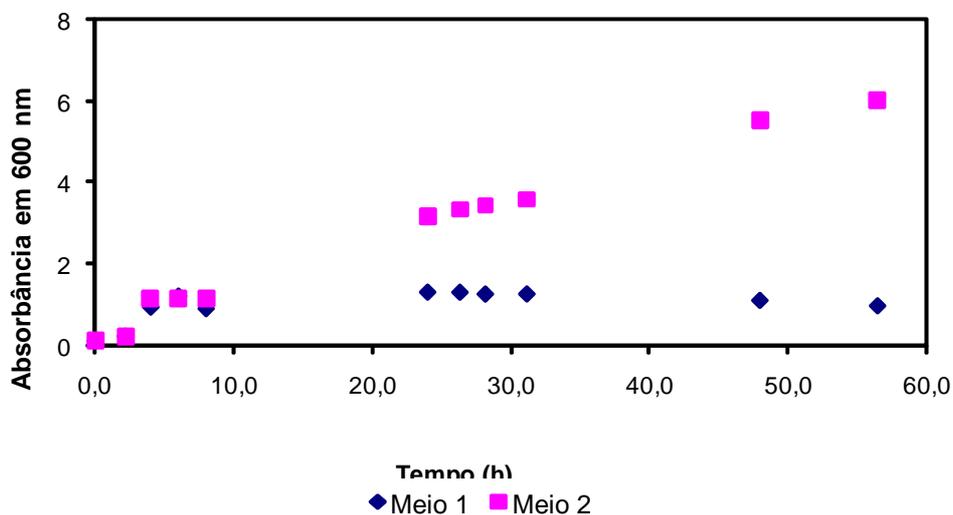
#### 4.9 Estudo do Processo de fermentação utilizando glicerina.

A glicerina é alcalina. O pH inicial é igual a 10,5. A Figura 4.10 mostra o crescimento do microorganismo em um meio formulado com glicerina. As condições de agitação e temperatura foram iguais a 170 rpm e 30 °C, respectivamente. As leituras das absorbâncias das amostras retiradas em um determinado tempo induzem ao erro no meio que contém glicerina, pois os sais precipitados deixam o meio embranquecido, dificultando as leituras de densidade óptica. Por isso, ao fim do processo de fermentação, o meio foi plaqueado em placas de petri, sendo possível comprovar que nenhum microrganismo estava crescendo no meio com glicerina.



**Figura 4.10:** Avaliação do crescimento celular em glicerina em frasco agitado com temperatura e agitação mantidas a 30° e 170 rpm respectivamente.

Após o tratamento da glicerina, como discutido na seção 3.14 um novo experimento foi realizado. A Figura 4.11 mostra que as células presentes sofreram uma fase lag. Com o intuito de comprovar a existência de microorganismo, foram realizados plaqueamentos no fim do processo e observou-se o crescimento de colônias. O Meio 1 corresponde ao cultivo em glicerina, enquanto o Meio 2 corresponde ao cultivo em glicerol PA.

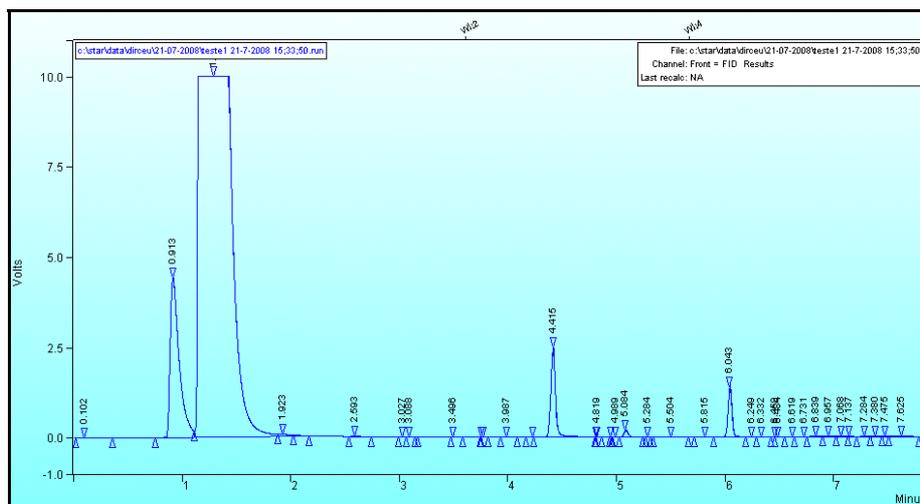


**Figura 4.11:** Avaliação do crescimento celular em glicerol PA e glicerina, sob agitação e temperatura de 170 rpm e a 30 °C respectivamente.

Observa-se que o crescimento em glicerina industrial é fortemente inibido, indicando que os resíduos industriais do processo de biodiesel devem ser purificados antes do uso para a produção de PHAs com *Bacillus sp.*

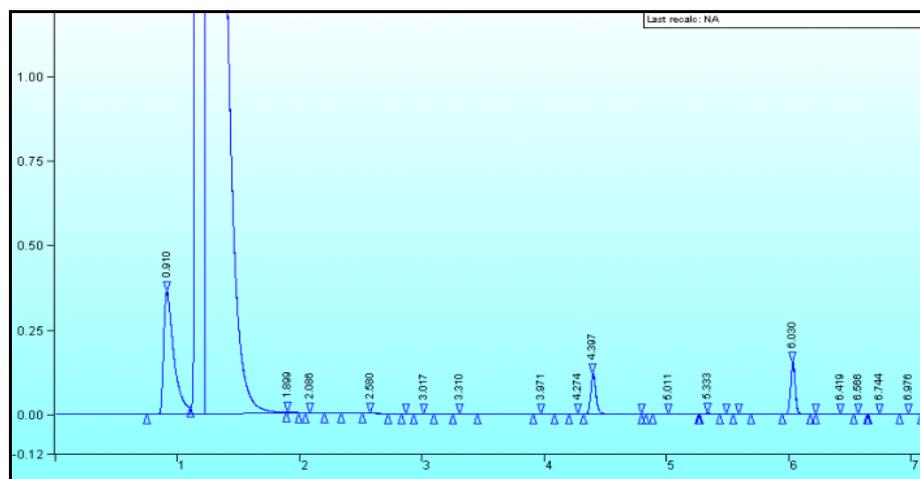
#### 4.10 Determinação de poli(3-hidroxibutirato)

No presente trabalho, o glicerol foi utilizado como única fonte de carbono para a produção de PHA por fermentação. O processo até aqui foi realizado em frascos agitados, a 30°C com agitação de 170 rpm. A Figura 4.12 representa o resultado obtido amostra comercial padrão do P(3HB). As amostras foram injetadas em duplicata. Os picos do P(3HB) e do padrão interno apresentam tempos de retenção iguais a 4,4 e 6,0 minutos, respectivamente.



**Figura 4.12:** Cromatograma do P(3HB) obtido da SIGMA-ALDRICH.

As amostras foram submetidas a propanólise e analisadas, uma utilizando como substrato o glicerol PA e glicerina. Os cromatogramas das amostras estão apresentados nas Figura 4.13 a 4.14.

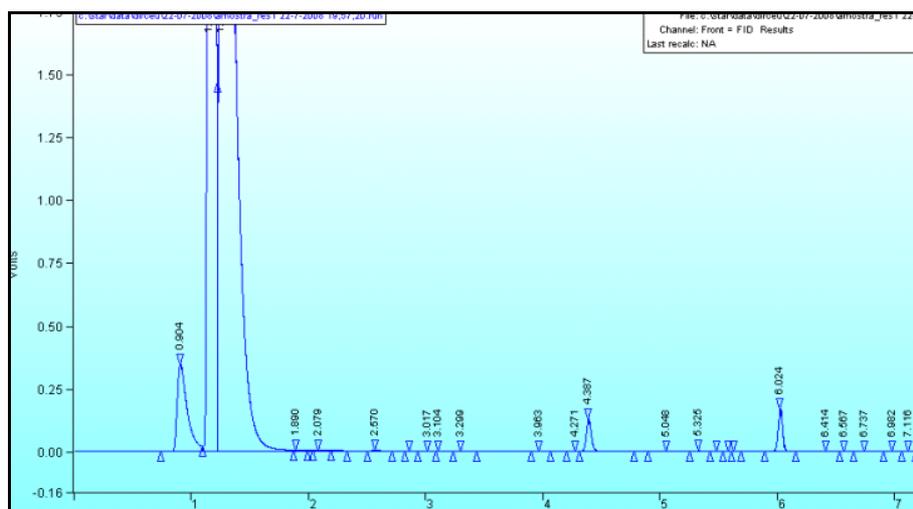


**Figura 4.13:** Cromatograma de uma amostra de células alimentadas com glicerina em frasco agitado.

As Figuras 4.13 e 4.14 mostram os cromatogramas das amostras de P(3HB) extraídas das células. Como pode ser observado, as amostras injetadas também possuem um pico característico no tempo de retenção igual a 4,4 minutos, indicando a produção do P(3HB) em ambos os meios. Com os dados da curva de calibração, foi possível calcular as quantidades de P(3HB) encontradas nas amostras.

O acúmulo de P(3HB) foi medido para amostras de **todas** as corridas realizadas. Em todas as análises, os teores de P(3HB) flutuaram entre 28% e 33% em relação à massa seca das células. Como não foi observada qualquer correlação com as variáveis manipuladas ou com as condições de reação, considera-se que o acúmulo de P(3HB) ocorre durante o crescimento celular e é igual a 30% em relação à massa seca das células, indicando significativo acúmulo de P(3HB), compatível com os dados similares reportados na literatura.

Foram injetadas amostras contendo apenas P(3HB) e outra contendo apenas o padrão interno para detectar o tempo de retenção.

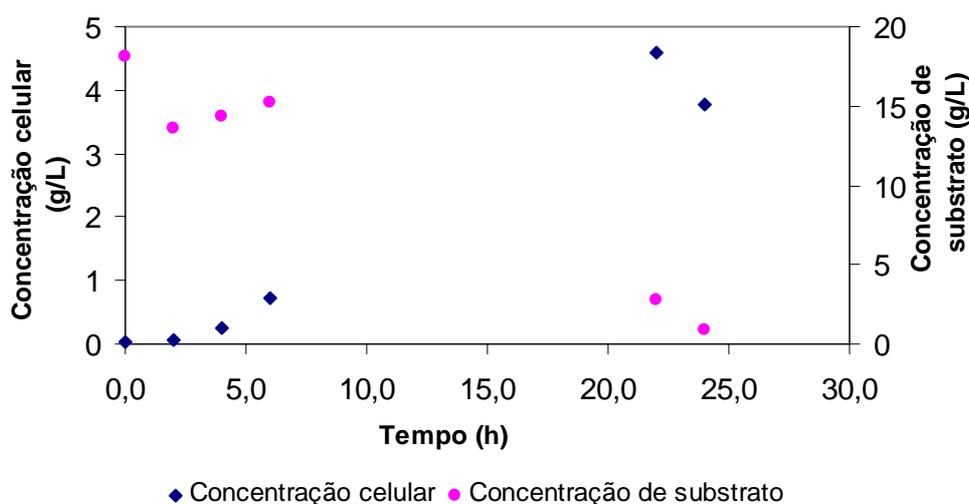


**Figura 4.14:** Cromatograma de uma amostra de células alimentadas com glicerol PA em frasco agitado.

#### 4.11 Cultivos em biorreator

Os resultados obtidos até o momento indicam que o microorganismo consome glicerol e produz P(3HB) durante o crescimento. Por isso, iniciou-se o estudo do cultivo do microorganismo em biorreator. Inicialmente foram realizados estudos em batelada e depois em batelada alimentada.

No processo em batelada foi possível acumular uma maior quantidade de células secas, como pode ser observado na Figura 4.15. A concentração máxima de células alcançada foi de  $4,5 \text{ g.L}^{-1}$  de células secas em um tempo de 23 horas de cultivo, em comparação com o valor de  $2 \text{ g.L}^{-1}$  em frascos agitados após um período de 48 horas. A Figura 4.15 mostra também que a concentração de substrato inicial de  $20 \text{ g.L}^{-1}$  caiu a zero no final da fermentação, após 24 horas. Esses resultados mostram que as condições melhoradas de aeração de fato contribuem com aumento expressivo das taxas de crescimento celular.

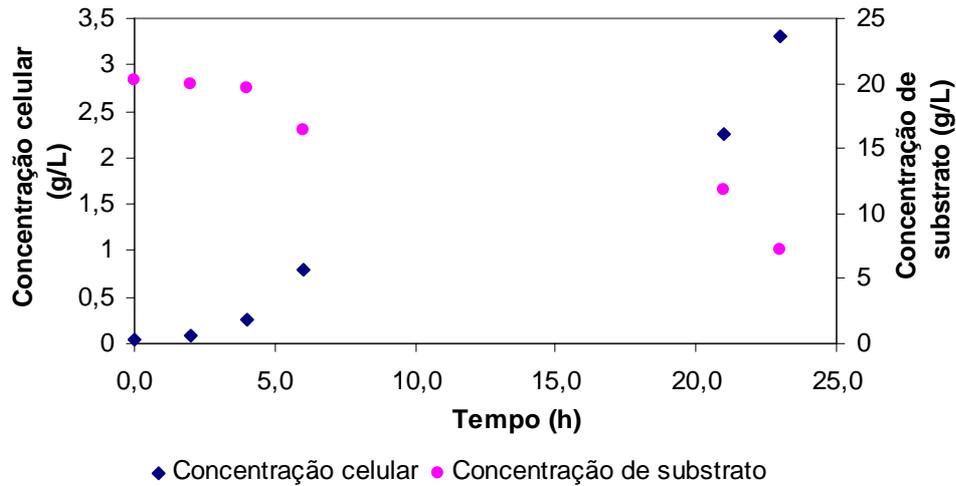


**Figura 4.15: Cultivo da bactéria *Bacillus sp.* em biorreator batelada com temperatura em  $30^\circ$ , com oxigênio dissolvido de 20% e pH 7,0.**

Outros cultivos foram conduzidos em batelada foram realizados, como apresentado na Figura 4.16. As condições usadas nos dois experimentos foram iguais: temperatura controlada em  $30^\circ\text{C}$ , agitação mantida a 200 rpm, o pH mantido a 7,00 e o oxigênio dissolvido mantido em 20% da saturação.

A partir dos dados obtidos foi possível calcular os fatores de conversão de glicerol em biomassa ( $Y_{xs}$ ), a partir da equação 4.2, como sendo iguais a 0,216 para o primeiro experimento e 0,252 para o segundo, confirmando os valores obtidos nos ensaios em frascos agitados. A análise de acúmulo de P(3HB) por cromatografia gasosa resultou em valores próximos a 30%, como também encontrado em frascos agitados.

As taxas específicas de crescimento foram iguais a  $0,50 \text{ h}^{-1}$  com 98% de ajuste para o primeiro experimento em batelada e  $0,48 \text{ h}^{-1}$  com 99% de ajuste para o segundo experimento.



**Figura 4.16:** Cultivo da bactéria *Bacillus sp.* em biorreator batelada com temperatura em 30°, com oxigênio dissolvido de 20% e pH 7,0

$$Y_{xs} = \frac{X_f - X_0}{S_f - S_0} \quad 4.2$$

onde X, S representam as massas de células e de fonte de carbono respectivamente. Os subíndices f e 0 representam os valores finais e iniciais das respectivas variáveis.

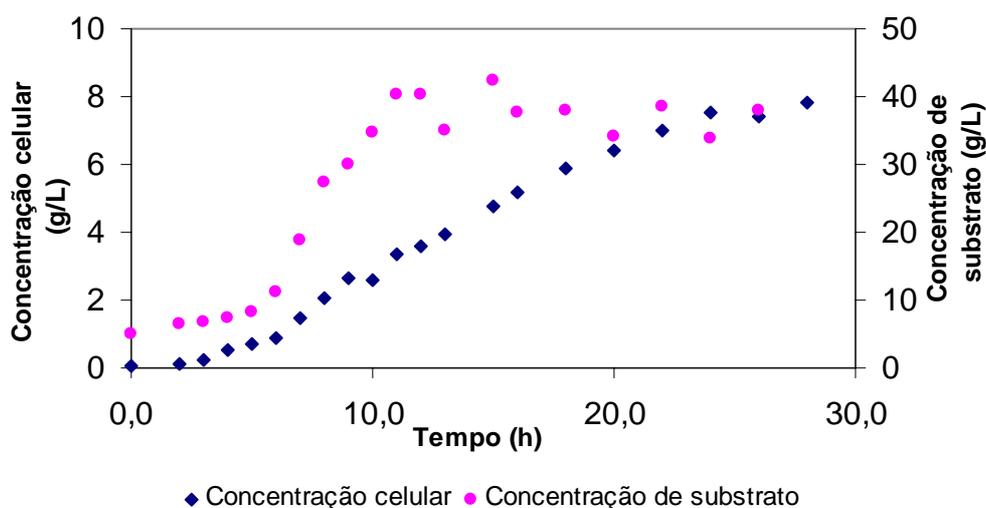
#### 4.11.2 Cultivos em biorreator em batelada alimentada

Vários testes foram conduzidos em biorreator em batelada alimentada com o intuito de aumentar a concentração celular. Foi controlada a razão entre carbono e nitrogênio. As soluções de alimentação foram preparadas, como descrito na seção 3.5, contendo glicerol e hidróxido de amônio concentrado. À medida que o valor do pH caía, essa solução era adicionada ao sistema para corrigir o pH, adicionando simultaneamente substrato ao sistema.

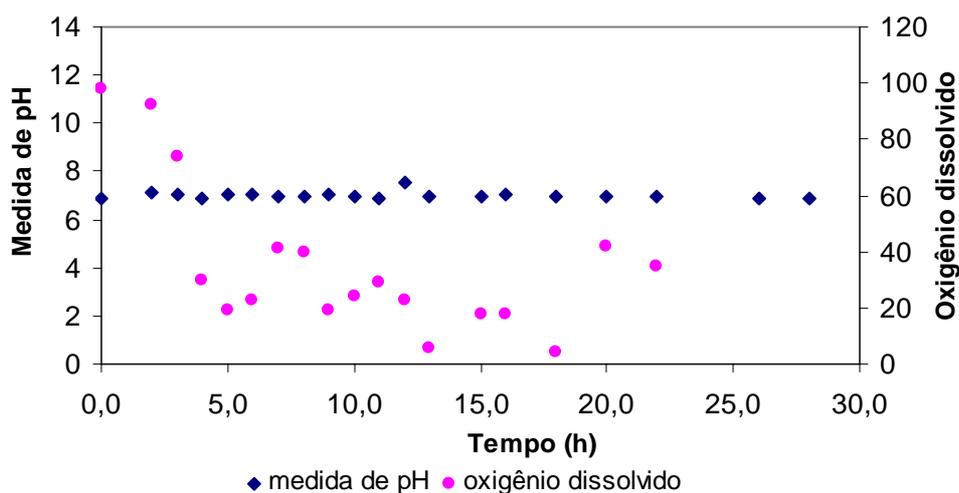
##### 4.11.2.1 Efeito da relação C/N igual a 7,28 no cultivo em biorreator em batelada alimentada

O primeiro cultivo em batelada alimentada foi realizado usando uma razão C/N igual a 7,28. A Figura 4.17 resume os resultados obtidos. A concentração de células secas atingidas por este processo foi igual a 8 g.L<sup>-1</sup>, maior valor até aqui obtido. A

concentração inicial do substrato era igual a  $5 \text{ g.L}^{-1}$ , enquanto a concentração final de substrato foi igual a  $40 \text{ g.L}^{-1}$ . Esta concentração de glicerol já causa efeito inibitório ao crescimento do microorganismo, como mostrado anteriormente. Na Figura 4.18 mostra-se o comportamento do pH e do oxigênio dissolvido durante o processo de fermentação. Como pode ser observado o pH foi mantido constante e igual a 7,0. O oxigênio dissolvido caiu no começo, devido ao crescimento celular, e flutuou ao redor do valor específico de 20%.



**Figura 4.17:** Cultivo da bactéria *Bacillus sp.* em biorreator batelada alimentada com as condições de temperatura em  $30^\circ$ , com oxigênio dissolvido de 20%, pH 7,0. A razão molar C/N utilizada foi de 7,4.

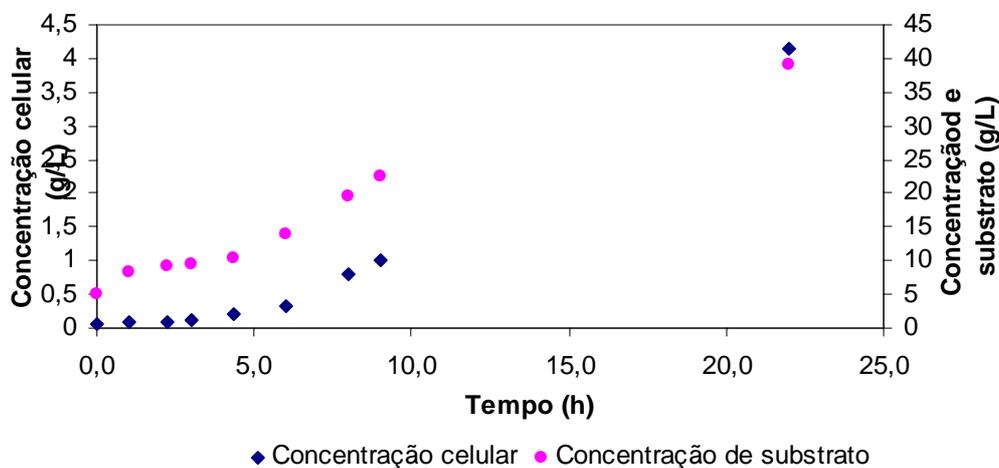


**Figura 4.18:** Perfis de pH e oxigênio dissolvido durante o processo, sobre as condições de temperatura em  $30^\circ$ , com oxigênio dissolvido de 20%, pH 7,0. A razão molar C/N utilizada foi de 7,4.

O fator de conversão de glicerol em biomassa encontrado neste experimento foi igual a 0,22 sendo similar aos valores encontrados anteriormente. A taxa específica de crescimento foi igual a  $0,48 \text{ h}^{-1}$ , de acordo com a regressão linear dos dados, com 97% de ajuste.

#### 4.11.2.2 Efeito da relação C/N igual a 5,0 no cultivo em biorreator em batelada alimentada

A razão de carbono e nitrogênio neste caso foi fixada em 5, com a finalidade reduzir a concentração de glicerol. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.19.

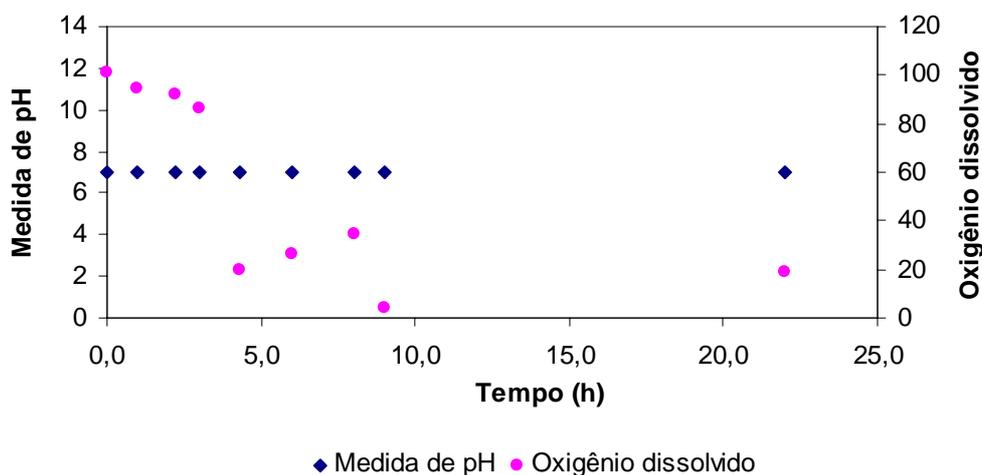


**Figura 4.19:** Cultivo da bactéria *Bacillus sp.* em biorreator batelada alimentada com as condições de temperatura em  $30^\circ$ , com oxigênio dissolvido de 20%, pH 7,0. A razão molar C/N utilizada foi de 5.

Como pode ser observado, a concentração de substrato continua a se acumular no meio fermentativo. Após 20 horas de cultivo, a concentração encontrada era igual a  $40 \text{ g.L}^{-1}$ , que corresponde a uma concentração que causa inibição ao crescimento do microorganismo. O aumento da concentração de glicerol foi devido à redução das taxas de crescimento celular. Por isso, a concentração máxima das células secas obtidas foi igual a  $4 \text{ g.L}^{-1}$ .

A Figura 4.20 mostra o comportamento do pH e do oxigênio dissolvido durante o processo de fermentação. Como no caso anterior, o perfil de controle de pH é constante, enquanto o perfil de controle de concentração de  $\text{O}_2$  é bastante irregular.

O fator de conversão de glicerol em biomassa encontrado neste experimento foi 0,12 bastante inferior dos outros valores já apresentados. A taxa específica de crescimento encontrada para este experimento foi igual a  $0,32 \text{ h}^{-1}$ , através de regressão linear dos dados, com 98% de ajuste. Os resultados indicam que a baixa relação C/N não parece apropriada para o cultivo.

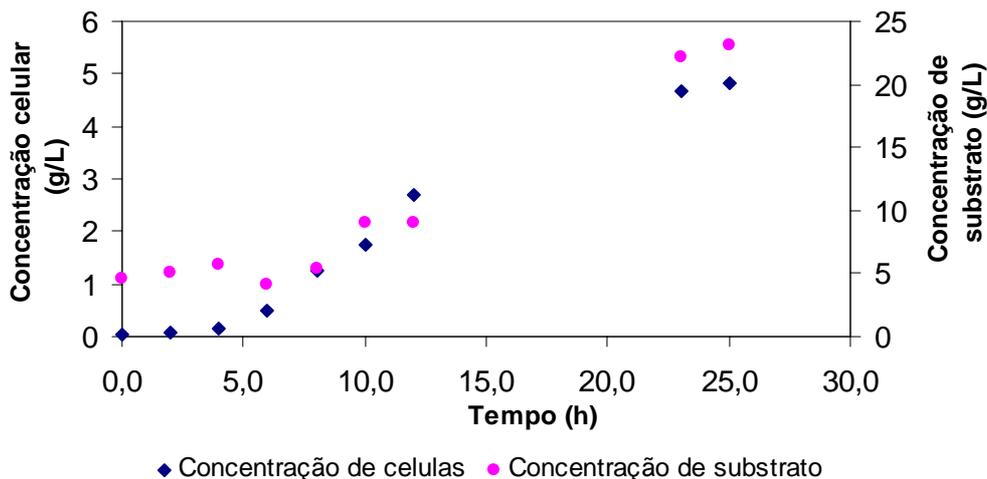


**Figura 4.20:** Perfis de pH e oxigênio dissolvido durante o processo, com as condições de temperatura em  $30^\circ$ , com oxigênio dissolvido de 20%, pH 7,0. A razão molar C/N utilizada foi de 5.

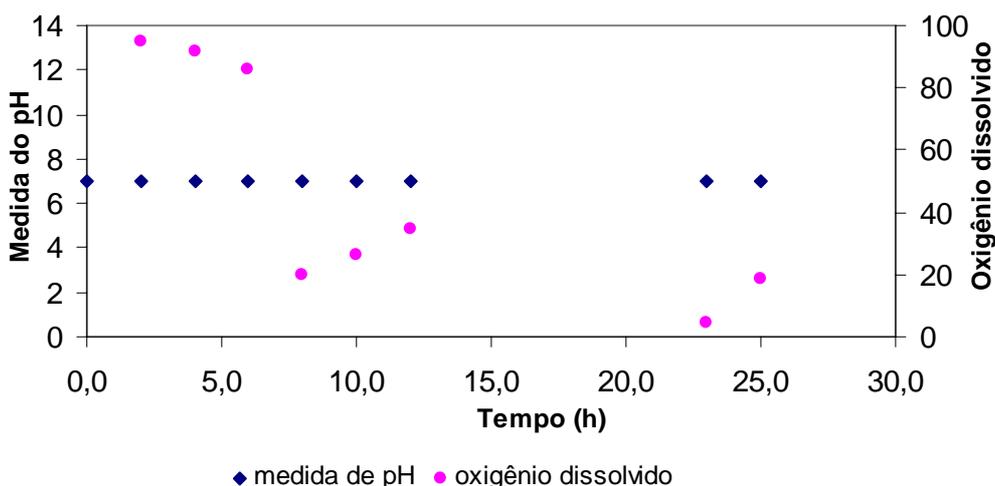
#### 4.11.2.3 Efeito da relação C/N igual a 2,5 no cultivo em biorreator em batelada alimentada

Um novo valor de razão C/N foi proposto para resolver o problema do acúmulo de glicerol durante o processo de alimentação. Neste caso foi proposta uma razão de 2,5. Os resultados são apresentados na Figura 4.21. Pode-se observar uma vez mais o acúmulo de glicerol no caldo fermentativo. Após 20 horas de fermentação, a concentração encontrada foi de  $25 \text{ g.L}^{-1}$ , inferiores aos valores encontrados anteriormente. Apesar disso, a máxima concentração celular atingida foi igual a  $5 \text{ g.L}^{-1}$ . A Figura 4.22 apresenta os resultados da medida do pH e do oxigênio dissolvido ao longo do processo fermentativo. Os resultados são similares aos mostrados nos casos anteriores.

O fator de conversão de glicerol em biomassa encontrado neste experimento foi igual a 0,25 como nos estudos anteriores. A taxa específica de crescimento foi igual a  $0,36 \text{ h}^{-1}$ , obtida por regressão linear.



**Figura 4.21:** Cultivo da bactéria *Bacillus sp.* em biorreator batelada alimentada, com as condições de temperatura em 30°, com oxigênio dissolvido de 20%, pH 7,0. A razão molar C/N utilizada foi de 2,5.

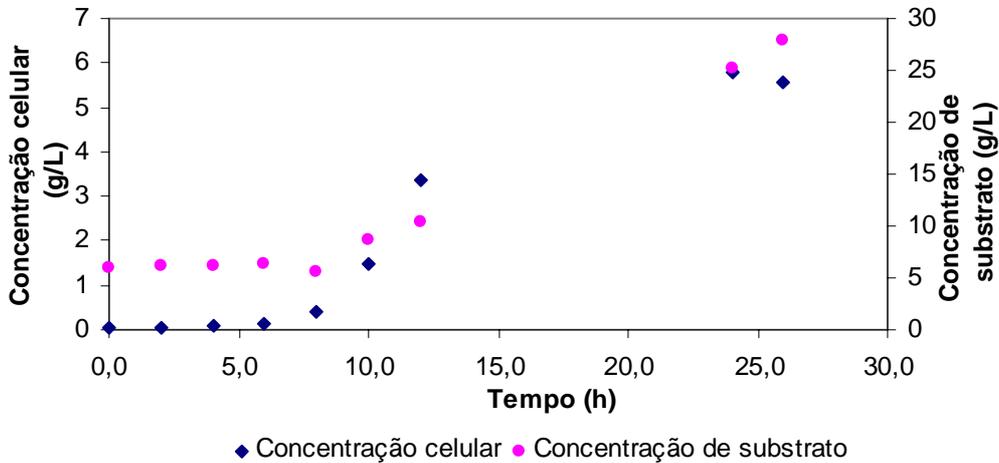


**Figura 4.22:** Perfis de pH e oxigênio dissolvido durante o processo, com as condições de temperatura em 30°, com oxigênio dissolvido de 20%, pH 7,0. A razão molar C/N utilizada foi de 2,5.

#### 4.11.2.4 Efeito da relação C/N igual a 2,5 no cultivo em biorreator em batelada alimentada

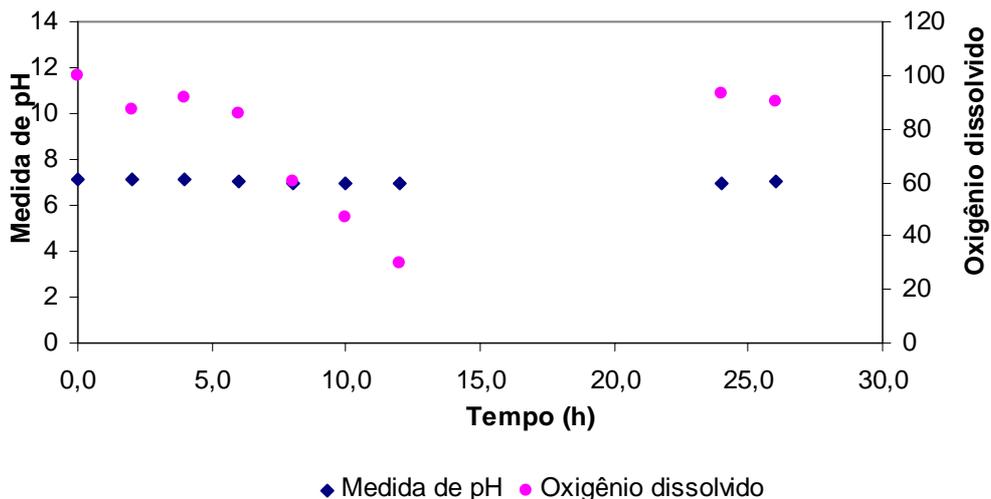
Preparou-se uma nova solução de alimentação utilizando 30 mL de uma solução de NH<sub>4</sub>OH 30% em massa e 60 g de glicerol, para um volume final de 400 mL de solução. A razão encontrada calculada por esta solução foi igual a 2,5 e os resultados do crescimento e da concentração de substrato estão presentes na Figura 4.23. Como pode ser observado pelo o gráfico apresentado, ainda foi observado acúmulo expressivo de

glicerol durante o processo fermentativo. Também pode ser observado um atraso no crescimento do microorganismo, prejudicando a concentração celular no final do processo.



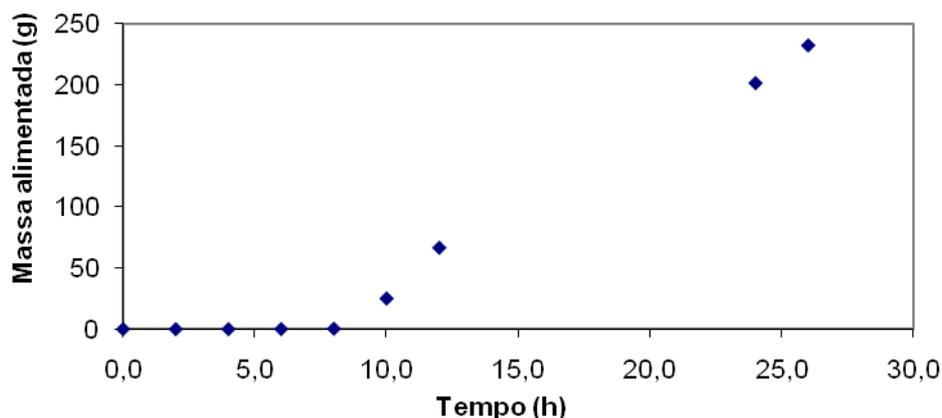
**Figura 4.23:** Cultivo da bactéria *Bacillus sp.* em biorreator batelada alimentada, com as condições de temperatura em 30°, com oxigênio dissolvido de 20%, pH 7,0. A razão molar C/N utilizada foi de 2,5.

O fator de conversão de glicerol em biomassa encontrado neste experimento foi igual a 0,25 como nos estudos anteriores. A taxa específica de crescimento foi igual a 0,38 h<sup>-1</sup>, obtida por regressão linear.



**Figura 4.24:** Perfis de pH e oxigênio dissolvido durante o processo, com as condições de temperatura em 30°, com oxigênio dissolvido de 20%, pH 7,0. A razão molar C/N utilizada foi de 2,5.

A Figura 4.24 mostra o comportamento do pH e do oxigênio dissolvido, similares aos comportamentos já apresentados. No entanto, observa-se atraso na queda de concentração de oxigênio dissolvido, por causa do atraso no crescimento microbiano.



**Figura 4.25:** Perfil da massa da solução de glicerol e hidróxido de amônio (razão molar C/N de 2,5) adicionada ao sistema durante o cultivo.

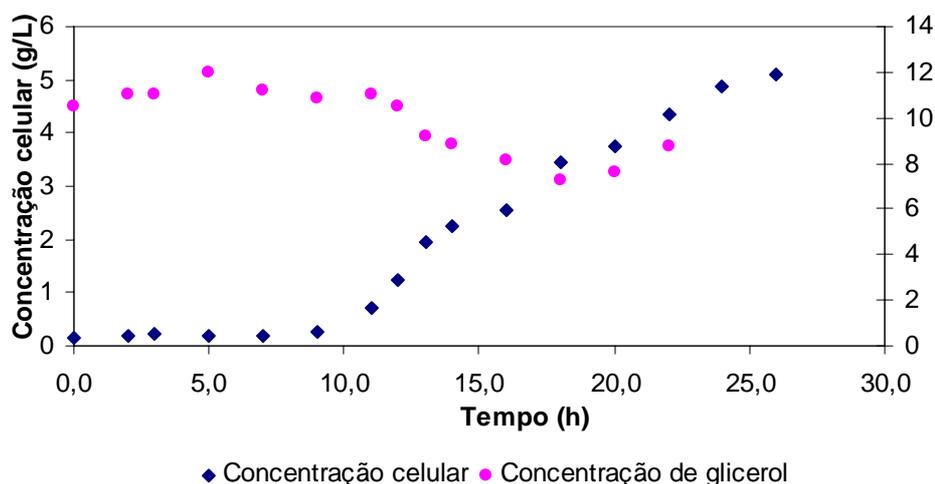
A massa da solução adicionada ao sistema durante o cultivo é mostrada na Figura 4.25. Em função das menores concentrações de glicerol e sulfato de amônio, maiores quantidades de solução são adicionadas.

O fator de conversão de glicerol em biomassa encontrado neste experimento foi igual a 0,25. O valor da taxa específica de crescimento foi igual a  $0,25 \text{ h}^{-1}$ .

#### **4.11.2.5 Efeito da relação C/N igual a 1,6 no cultivo em biorreator em batelada alimentada**

Preparou-se uma nova solução de alimentação utilizando 61 mL de uma solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  30% em massa e 80 g de glicerol para um volume final de 400 mL. A razão C/N é igual a 1,6 e os resultados do crescimento e da concentração de substrato estão apresentados na Figura 4.26. Como no caso anterior, o objetivo básico foi o de reduzir o conteúdo de glicerol no meio. Neste caso a concentração de substrato pode ser mantida na faixa de 8 a  $12 \text{ g.L}^{-1}$ . Segundo os estudos realizados, esta concentração não é inibitória para o microorganismo. Contudo, a concentração final de células secas foi de  $5 \text{ g.L}^{-1}$ . Este valor já havia sido alcançado nas fermentações conduzidas em batelada. Contudo, observa-se uma fase estacionária no começo da fermentação o que prejudicou

a obtenção de uma concentração maior de células. O valor do pH foi mantido constante durante o processo e o oxigênio dissolvido não pode ser medido durante o processo, devido a problemas de medição depois da autoclavação. O oxigênio dissolvido foi controlado pela a válvula de entrada de ar: à medida que as células cresciam a vazão de ar era aumentada.



**Figura 4.26:** Cultivo da bactéria *Bacillus sp.* em biorreator batelada alimentada, com as condições de temperatura em 30°, com oxigênio dissolvido de 20%, pH 7,0. A razão molar C/N utilizada foi de 1,6.

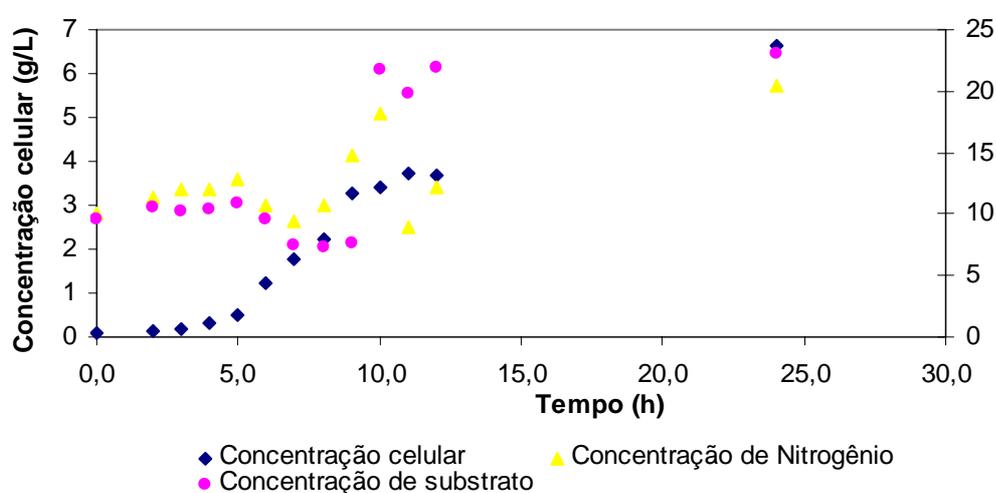
A taxa específica de crescimento foi igual a  $0,19 \text{ h}^{-1}$ , por regressão linear dos dados.

#### 4.11.2.6 Efeito da relação C/N igual a 1,6 no cultivo em biorreator em batelada alimentada

Como no experimento anterior foi possível manter a concentração de glicerol dentro de um intervalo não inibitório para as células, um novo teste foi realizado para corrigir o problema de inoculação. A intenção deste experimento era preparar um pré-inoculo que pudesse ser utilizado para inocular o biorreator em sua fase exponencial. Assim repetiram-se as condições de operações anteriores, preparando-se uma solução de alimentação utilizando 61 mL de uma solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  30% em massa e 80 g de glicerol para um volume final de 400 mL. A razão C/N foi de 1,6 e os resultados do crescimento e da concentração de substrato estão presentes na Figura 4.27.

Neste experimento foi medida a concentração de nitrogênio durante o processo fermentativo, para descartar a hipótese de que altas concentrações de células não estavam sendo alcançadas por falta de algum nutriente essencial.

O pH foi controlado durante todo o processo, mantendo-se igual a 7. O oxigênio dissolvido foi mantido em 20%, com as flutuações operacionais usuais. Como observado na Figura 4.27 a concentração de células atingiu  $7 \text{ g.L}^{-1}$ . As células começaram a crescer assim que foram inoculadas. As concentrações de glicerol mantiveram-se em um intervalo de 10 a  $25 \text{ g.L}^{-1}$  enquanto a concentração de nitrogênio durante o processo manteve em uma concentração adequada às células.



**Figura 4.27:** Cultivo em biorreator em batelada alimentada, com as condições de temperatura em  $30^\circ$ , com oxigênio dissolvido de 20%, pH 7,0. A razão molar C/N utilizada foi de 1,6.

Após 10 horas de cultivo o crescimento celular mostrou sinal de estabilização. Por isso, adicionou-se glicerol e sulfato de amônio ao sistema com o intuito de fazer as células crescerem mais. Apesar disso, como podemos comprovar na Figura 4.27, nem o glicerol e nem o sulfato de amônio estavam em falta até este momento.

O fator de conversão de glicerol em biomassa encontrado neste experimento foi de 0,48. Esse valor é bastante superior aos demais, mostrando que as baixas concentrações de glicerol favorecem o crescimento celular e a conversão do glicerol em massa celular. O valor encontrado para a taxa específica de crescimento foi igual a  $0,41 \text{ h}^{-1}$ .

A política de alimentação em semi-batelada permitiu o aumento de concentração celular, mesmo quando houve acúmulo expressivo de glicerol do meio. Apesar disso, a

máxima concentração celular atingida foi de  $8 \text{ g.L}^{-1}$ , que pode ser ainda considerada baixa. Como em todos casos o conteúdo de P(3HB) foi um pouco superior a 30%, é possível dizer que a máxima produção de P(3HB) atingida foi equivalente à cerca de  $2,5 \text{ g (P(3HB)).L}^{-1}$ . Portanto, há incentivo para o desenvolvimento de estratégias mais elaboradas de operação em regime semi-batelada, para maximização da produção de P(3HB) a partir do glicerol.

#### **4.12 Extração do Poli(3-hidroxiacanoato)**

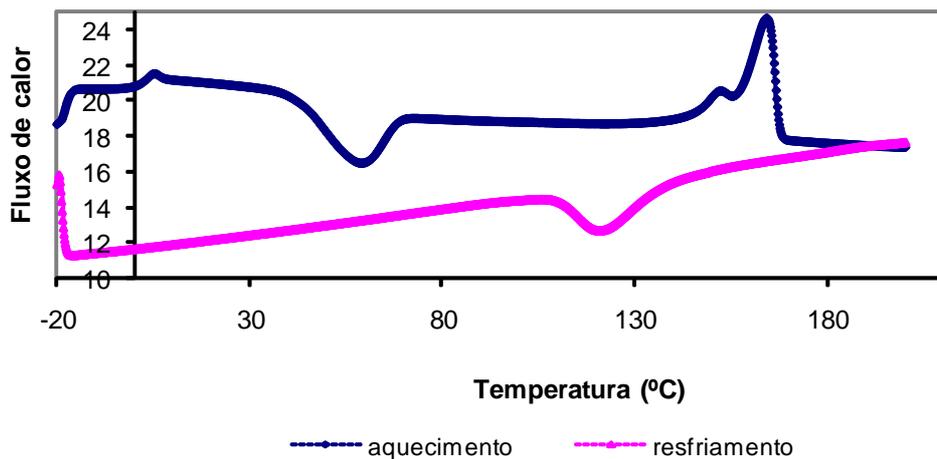
O método descrito no Capítulo 3 foi aplicado para extrair o biopolímero da massa celular. As amostras obtidas foram enviadas para caracterização.

#### **4.13 Comportamento térmico**

As extrações realizadas permitiram coletar quantidade suficiente para a caracterização de amostras produzidas.

##### **4.13.1 Análise Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)**

O comportamento térmico das amostras de P(3HB) padrão e o P(3HB) produzido utilizando glicerol foi estudado por calorimetria diferencial de varredura (DSC). As análises térmicas das amostras foram realizadas, de acordo com as condições descritas no Capítulo 3. A Figura 4.28 mostra o comportamento do padrão P(3HB) durante a análise diferencial de varredura (DSC). Foram observadas três transições distintas para o P(3HB) comercial, durante o segundo ciclo de aquecimento. Inicialmente, um pequeno pico a  $1,7^\circ\text{C}$  é referente à temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ). Logo depois, um pico a  $53^\circ\text{C}$  é referente à temperatura de cristalização no aquecimento ( $T_{hc}$ ). Por fim, um pico relativo à temperatura de fusão é observado em  $174^\circ\text{C}$ . No segundo ciclo de resfriamento foi observado, a  $87^\circ\text{C}$ , um pico referente à temperatura de cristalização no resfriamento ( $T_{cc}$ ).

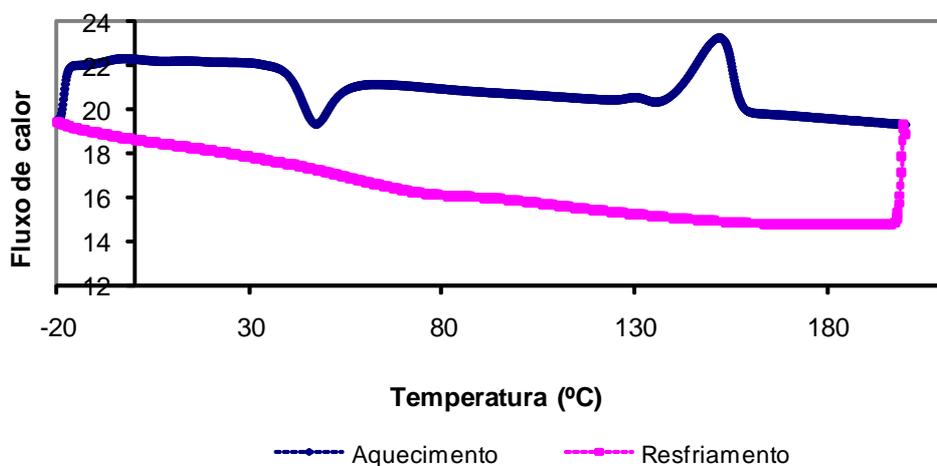


**Figura 4.28:** Curvas térmicas obtidas por DSC de P(3HB) comercial.

A Figura 4.29 mostra o comportamento da amostra extraída das células. A partir das curvas térmicas do P(3HB) padrão e o P(3HB) extraído das células foi possível calcular os dados térmicos característicos das amostras das mesmas, os quais são mostrados na Tabela 4.5.

**Tabela 4.5** – Dados térmicos obtidos dos termogramas de P(3HB) padrão e amostra extraída do meio de cultivo.

Amostras	$T_g$ (°C)	$T_{hc}$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)	$T_{cc}$ (°C)	$X_c$ (%)
P(3HB) padrão	1,1	47,9	173,0	77,6	92,6	53
P(3HB) obtido	-0,3	42,9	160	65,6	86,6	45



**Figura 4.29:** Curvas térmicas obtidas por DSC de P(3HB) extraído.

#### 4.14 Discussão das análises de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  das amostras de PHAs estão no apêndice 02 mostrando os sinais com deslocamentos químicos praticamente idênticos aos do espectro obtido para o P(3HB) comercial. Esses resultados, assim como aqueles obtidos por DOI *et al.*, (1986) e por OLIVEIRA (2004) por fermentação no estado sólido (FSS), são listados na Tabela 4.6, expressos em termos de deslocamento químico ( $\delta$ ) dos diferentes tipos de carbonos presentes na estrutura do P(3HB).

**Tabela 4.6** – Deslocamento químicos de P(3HB) comercial, como padrão, análise obtida por Doi et al., 1986 e Oliveira, 2004 e o P(3HB) produzido com glicerol.

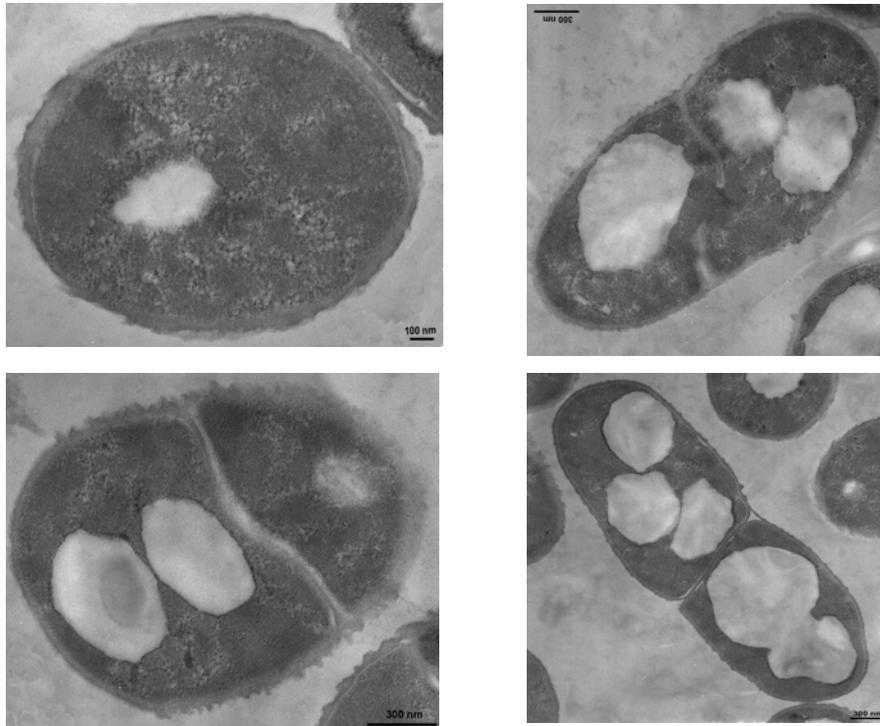
Tipos de carbono	$\delta$ (ppm) (RMN $^{13}\text{C}$ )			
	P(3HB) (Doi et al., 1986)	P(3HB) PA	P(3HB) (Oliveira, 2004)	P(3HB) (Este Trabalho)
CH <sub>3</sub>	19,76	20,358	19,66	20,358
CH <sub>2</sub>	40,77	41,235	40,68	41,24
CH	67,40	68,19	67,49	67,67
C = O	169,14	169,88	169,01	169,89

Portanto, o material obtido é similar ao P(3HB) comercial. Sendo assim as transições térmicas diferenciadas devem ser devidas a massas molares ou impureza na amostra.

#### 4.14 Discussão sobre os resultados de microscopia eletrônica

Para finalizar os estudos realizados até aqui, foi realizada uma microscopia eletrônica de um dos tubos armazenados com células, Os resultados são apresentados na Figura 4.30. Vê-se claramente que os microorganismos podem acumular múltiplos grãos de P(3HB), que podem ser divididos entre as células filhas durante a duplicação celular. O conteúdo de P(3HB) não é homogêneo, já que algumas células (Figura 28a) apresentam pequenas quantidades de polímero, enquanto outras (Figura 28d) apresentam concentrações elevadas do poliéster em sua estrutura. Esse aspecto da

produção de P(3HB) tem sido pouco discutido na literatura, embora GAMBETTA (2006) tivesse levantado a hipótese de que o polímero fabricado por células diferentes pudesse não ter a mesma estrutura.



**Figura 4.30:** Microscopia eletrônica do *Bacillus sp.* produtor de P(3HB).

#### 4.15 Discussão sobre a identificação de bactérias

As colônias isoladas em cultivo em meio sólido (NA) apresentaram aspecto homogêneo, sem evidência de contaminação. A análise microscopia revelou a presença de bastonetes com coloração Gram positiva para as amostras.

Os fragmentos do gene RNA ribossomal 16S foram amplificados com sucesso a partir do DNA genômico extraído da amostra. O produto de amplificação foi purificado em coluna (GFX PCR DNA and gel Band Purification Kit, GE Healthcare) e submetido ao sequenciamento usando o sistema MegaBASE (GE Healthcare).

A seqüência parcial do gene RNAr 16S da amostra apresentou 100% de similaridade com as seqüências de RNAr 16S de vários *Bacillus*, entre elas *Bacillus flexus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis*, assim como com seqüência de RNAr 16S de linhagens de *Bacillus sp.* não identificadas contidas nas bases de dados consultadas.

A análise filogenética recuperou a amostra em um agrupamento coeso e suportado por alto valor de bootstrap (100%) juntamente com linhagens tipo de *Bacillus flexus*, *Bacillus simplex* e *Bacillus megaterium*. Estes resultados sugerem que o gene RNAr 16S é muito conservado dentre estas espécies de *Bacillus*, não oferecendo resolução para identificação em nível de espécie.

## Capítulo 5

### Conclusões e sugestões

#### 5.1 Conclusões

Foi estudado o processo de fermentação de *Bacillus sp.* na presença de glicerol como única fonte de carbono em frascos agitados e em biorreator. Mostrou-se que o microorganismo é capaz de crescer de glicerol, utilizando este substrato como única fonte de carbono. Mostrou-se ainda que a concentração de glicerol produz um efeito inibitório sobre o crescimento do microorganismo em concentrações superiores a 20 g.L<sup>-1</sup>. Por sua vez, as concentrações de sulfato de amônio podem causar efeito de inibição ao crescimento do microorganismo na faixa estudada de 2 a 9 g.L<sup>-1</sup>.

Foram desenvolvidos testes, visando à substituição do glicerol PA por glicerina residual obtida de plantas de biodiesel. Foi mostrado, no entanto, que o microorganismo não é capaz de crescer em meio mínimo tendo como única fonte de carbono a glicerina produzida nas plantas de biodiesel não tratadas. O microorganismo só conseguiu crescer no meio mínimo tendo glicerina como única fonte de carbono após adicionar uma etapa de tratamento ao processo. Mesmo assim, o crescimento não foi expressivo.

Mostrou-se que o microorganismo acumula P(3HB) durante o crescimento e que a quantidade de P(3HB) acumulada pelas células cultivadas em glicerol e glicerina flutua ao redor de 30% de massa seca. As análises de DSC mostraram que as amostras extraídas têm comportamento um pouco distinto da amostra de P(3HB) comercial, devido a falta de um pico durante o resfriamento, mas no caso do aquecimento os picos foram similares nas duas amostras.

As fermentações conduzidas em frascos mostraram que a aeração do processo é uma variável importante para o crescimento do microorganismo.

Realizando um cultivo em biorreator, em batelada alimentada foi possível aumentar a concentração de celular.

Com as análises de RMN <sup>13</sup>C mostraram que as amostras extraídas possuem uma estrutura similar à de amostra de P(3HB) comercial. Conclui-se que as diferenças observadas podem ser devidas à impureza ou a massas molares mais baixas. Como observado experimentalmente em outras referências aqui estudadas. As massas molares

obtidas são realmente mais baixas, provavelmente por causa do efeito de transferência de cadeia induzida pelos grupamentos hidroxila do glicerol.

O microorganismo estudado durante este trabalho não precisa de duas etapas em seu processo de cultivo, pois este, assim como *Alcaligenes latus* e *Azotobacter vinelandii*, acumula PHA durante o seu processo de crescimento.

## 5.2 Sugestões

Desenvolver uma estratégia de controle de alimentação de nutrientes em biorreator, para a obtenção de uma maior densidade celular.

Desenvolvimento de estratégias para aumentar a concentração de P(3HB) acumulado nas células.

Estudar o fator de limitação da aeração em biorreator, aumentar a concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo utilizando filtro de membrana.

Explorar mais a produção de P(3HB) utilizando como única fonte de carbono a glicerina.

Utilizar outras formas de extração de P(3HB), com o objetivo de obter um biopolímero mais puro e realizar a caracterização através de RMN, DSC e GPC.

Fazer análise de GPC do material extraído para conhecer a distribuição de curva molar.

## Referências Bibliográficas

- ACKERMANN, J. U., BABEL, W., 1998, “Approaches to increase the economy of the PHB production”, *Polymer Degradation and Stability*, v. 59, p. 183-186.
- ALMEIDA, A., RUIZ, A. J., LÓPEZ, I. N., PETTINARI, J. M., 2004, “Bióplásticos: una alternative ecológica”, *Química Viva*, v. 3.
- AKIYAMA, M, TSUGE, T., DOI, Y., 2002 “Environmental life cycle comparison of PHAs produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation.” *Polymer Degradation and Stability*, v. 80, p. 183 – 194.
- ARRUDA, P. V., RODRIGUES, R. C. L. B., FELIPE, M. G. A., 2007 “Glicerol um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica.”, *Revista Analytica* , v. 26, pp. 56 – 62.
- BRAUNEGG, G. E BONGENSBERGER, B., 1978, “A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass”, *Acta Biotechnol.*, v. 6, pp. 29-37.
- BRAUNEGG, G., LEFEBVRE, G., GENSER F. KLAUS, 1998, “Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects”, *Journal Biotechnology*, v. 65, pp. 127-161.
- BRAMDL, H., GROSS, A. R., LENZ, R. W., FULLER, R. C., 1990, “Plastics from bacteria and for bacteria: poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters”, *Advances in Biochemical Engineering*, v. 41, pp. 77-93.
- BREUER, U., TARENTIEV, Y., KUNZE, G., BABEL, W., C., 2002, “Yeast as producer of polyhydroxyalkanoates: genetic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*”, *Macromolecular Bioscience*, v. 2, pp. 380 – 386.

- CASTILHO, R. L., FREIRE, M.G. D., DIAS, L. M., OLIVEIRA, C. F., 2006 “Characterization of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* in solid-state fermentation.”, *Bioresource Technology*, v. 98, p. 633-638.
- CHAKRABARTI, T., MUDLIAR, N. S., KUMAR, S. M., KHARDENAVIS, A. A., 2007 “Biotechnological conversion of agro-industrial wastewaters into biodegradable plastic polyhydroxybutyrate.”, *Bioresource Technology*, v. 98, p. 3579-3584.
- CHEN, J., YAN, Q., DU, G., 2003 “Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with continuous feeding of mixed organic acids as carbon sources by *Ralstonia eutropha*.”, *Process Biochemistry*, v. 39, p. 387-391.
- CHOI J., LEE SY. 1997, “Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation.”, *Bioprocess*, v. 42, pp. 17-335.
- DAAE, E. B., DUNNIL, P., 1999 “Metabolic modeling as a tool for evaluating polyhydroxyalkanoates copolymer production in plants.”, *Metabolic Engineering*, v. 1, pp. 243 – 254.
- DOI, Y., MAKAMURA, Y., KUNIOKA, M., SOGA, K., 1986, “<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR analysis of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) isolated from *Bacillus megaterium*”, *Macromolecules*, v. 19, pp. 2860-2864.
- ENGELBERG, I., KOHN, J., 1991, “Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: a comprehensive study”, *Biomaterials*, v. 12, pp. 292-304.
- FINKLER, L., 2006 “Produção de poli(hidroxiálcanoatos) por *Cupriavidus necator* usando ácido acrílico como fonte de carbono.”, Tese de doutorado, Programa de Engenharia Química, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ – Brasil.

- FREIER, T., KUNZE, C., NISCHAN, C., KRAMER, S., STERNBERG, K., SAB, M., HOPT, U. T., SCHMITZ, K. P., 2002, “In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patch based on poly(3-hydroxybutyrate)” *Biomaterials*, v. 23, pp. 2649-2657.
- GAMBETTA, R., 2006 “Análise teórica e experimental da curva de distribuição de massa molares do poli(3—hidróxi-butirato) produzido pela bactéria *Alcaligenes latus*.”, Tese de doutorado, Programa de Engenharia Química, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ – Brasil.
- HU, Y., SATO, H., ZHANG, J., NODA ISAO, OZAKI, Y., 2008, “Cystallization behavior of poly(l-lactic acid) affected by the addition of a small amount of poly(3-hydroxybutyrate)”, *Polymer*, v. xxx, pp. 1-7.
- JACQUEL, N., LO, C-W, WEI, Y-H., WU, H-S., WANG, S. S., 2007 “Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxybutyrate).”, *Biochemical Engineering Journal*, v. 39, pp. 15 – 27.
- JIANG, Y., SONG, X., GONG, L., LI, P., DAI, C., SHAO, W., 2007 “High poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) production by *Pseudomonas fluorescens* A2a5 from inexpensive substrates.”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 42, pp. 167 – 172.
- KALIA, V. C., JOSHI, A.P., 1995, “Conversion of waste biomass (peashells) into hydrogen and methane through anaerobic digestion”, *Bioresource Technology*, v. 53, p. 165-168.
- KAPRITCHKOFF, M F., VIOTTI, P. A., ALLI C.P. R., ZUCCOLO M., PRADELLA, G.C. J., MAIORANO, E. A., MIRANDA, A. E., BONOMI, A., 2005 “Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*.”, *Journal of Biotechnology*, v. 122, p. 453 – 462.
- KELLER, J., YUAN, Z., LAMBERT, L., DAI, Y., 2008 “Characterisation of polyhydroxybutyrate copolymers with controllable four monomer composition.”, *Journal of Biotechnology*, v. 134, p. 134-145.

- KHANNA, S., SRIVASTAVA, A.K., 2006, "Computer simulated fed-batch cultivation for over production of PHB: A comparison of simultaneous and alternate feeding of carbon and nitrogen", *Biochemical Engineering Journal*, v. 27, pp. 197-203.
- KIM, Y. D., KIM, B. Y., RHEE, H. Y., 2000 "Evaluation of various carbon substrates for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates bearing functional groups by *Pseudomonas putida*.", *Biological Macromolecules*, v. 28, p. 23 – 29.
- KOYAMA, N., DOI, Y., 1993, "Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from various carbon sources by batch-fed cultures of *Alcaligenes eutrophus*", *Journal of Environmental Polymer Degradation*, v. 3, pp. 235 – 240.
- LEE, S. Y., CHOI, J-I., 1997, "Effect of fermentation performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*", *Polymer Degradation and Stability*, v. 59, pp. 387-393.
- LEE, W., H., LOO, C. Y., NOMURA C., T., SUDESH, K., 2008, "Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors", *Bioresource technology*.
- LEE, K-M., GILMORE, D. F., 2003 "Formulation and process modeling of biopolymer (polyhydroxyalkanoates: PHAs) production from industrial waste by novel experimental design.", *Process Biochemistry*, v. 40, p. 229 – 246.
- LEE, S. Y., CHOI, J-I., WONG W. H., 1998, "recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review", *Biological Macromolecules*, v. 25, pp. 31-36.
- LUCAS, E. F., SOARES, B. G., MONTEIRO, E., 2001, "Caracterização de polímeros determinação de peso molecular e análise térmica", *e-paper*, v. único.

- MADISON, L.L.; HUISMAN, G. W., 1999, “Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic”, *Microbiology and Molecular Biology Review*, v. 63, n. 1, p. 21 – 23.
- MANTZARIS, V. N., KELLEY, S. A., DAOUTIDIS, P., SRIENC, F., 2002 “A population balance model describing dynamics of molecular weight distributions and the structure of PHA copolymer chains.”, *Chemical Engineering Science*, v. 57, p. 4643-4663.
- MONTEIL-RIVERA, F., BETANCOURT, A., TRA, H. V., YEZZA, A., HAWARI, J., 2007, “Use of headspace solid-phase microextraction for the quantification of poly(3-hydroxybutyrate) in microbial cells“, *Journal of Chromatography A*, v. 1154, pp. 34-41.
- NIKEL, P., PETTINARI, J., MENDEZ, B., 2001 “Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in microaerobic fedbatch cultures by a recombinant *Escherichia coli* arcA mutant using glycerol as a carbon source.”, *Advanced Drug Delivery Reviews* , v. 53, pp. 5 – 21.
- OLIVEIRA, F. C., 2004 “Produção de poli(3-hidroxiálcanoatos) por fermentação no estado sólido.”, Tese de mestrado, Programa de Engenharia Química, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ – Brasil.
- PARK, S., J., CHOI, J.-I., LEE, S. Y., 2005, “ Engineering of *Escherichia coli* fatty acid metabolism for the production of polyhydroxyalkanoates”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 36, pp. 579-588.
- PATHWARDHAN, P.R., SRIVASTAVA, A.K., 2004, “ Model-based fed-batch cultivation of *R. eutropha* for enhanced biopolymer production”, *Biochemical Engineering Journal*, v. 20, pp. 21-28.
- POIRIER, Y., 2002, “ Polyhydroxyalkanoates synthesis in plant as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism”, *Prog. Lipid. Res.*, v. 41, pp 131 – 155.

- POIRIER, Y., NAWRATH, C., SOMERVILLE, C., 1995, “ Production of polyhydroxyalkanoates a family of biodegradable plastics and elastomers in bacteria and plants”, *Biotechnology*, v. 13, pp. 142 – 150.
- RAMSAY, B. A., RAMSAY, J. A., JIANG, X., 2006 “Acetone extraction of mcl-PHA from *Pseudomonas putidas* KT2440”, *Journal of Microbiological Method*, v. 67, p. 212-219.
- REDDY, C.S.K., GHAI, R., RASHMI; KALIA, V.C., 2003 “Polyhydroxyalkanoates: an overview”, *Bioresource Technology*, v. 87, p. 137-146.
- REIS, M. A. M., CRESPO, J.P.S.G., RAMOS, A.M., SALGUEIRO, E.N., VIANA, C., LEMOS. P.C., 1998 “Effect of carbon source on the formation of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a phosphate-accumulating mixed culture.”
- RIIS, V., E MAI, V. (1988), “Gas chromatographic determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis”, *Journal of Chromatography*, v. 445, pp. 285-289.
- ROSA, S. D., CHUI H., S., Q., 2002 “Avaliação da biodegradação de poli- $\beta$ -(hidroxibutirato), poli- $\beta$ -(hidroxibutirato-co-valerato) e Poli- $\epsilon$ -(caprolactona) em solo compostado.”, *Polímeros: ciência e tecnologia*, v. 12, p. 311-317.
- ROY, I., VALAPPIL S.P., MISRA, S.K., BOCCACCINI A.R., KESHAVARZ T., BUCKE C., 2007 “Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterized *Bacillus cereus* SPV.”, *Journal of Biotechnology*, v. 132, p. 251-258.
- SCHMIDELL, W., LIMA, U. U, AQUARONE, E., BORZANI, W., 2001, “*Biotechnologia industrial*”, v. 2, PP. 277-279.
- SCOTT, G., 2000, “*Greens Polymers, Polymer Degradation and Stability*, v. 68, p. 1-7.

- SERAFIM, L. S., LEMOS, P. C., LEVANTESI, C., TANDOI, V., SANTOS, H., REIS, M. A.M., 2002 “Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms.”, *Journal Microbiological Method*, v. 51, pp. 1 – 18.
- SHAH, A. A., HASAN, H., HAMEED, A., AHMED, S., 2008 “Biological degradation of plastics: A comprehensive review.”, *Biotechnology advances*, v. 26, pp. 246 – 265.
- SHIN, S. K., KIM, H. Y., RHEE, H. Y., 2005 “Characterization of an extracellular PHAS depolymerase from the marine isolate *Pseudomonas luteola* M13-4.”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, p. 529-535.
- SILVA, G. P., MACK, M., CONTIERO, J., 2009 “Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology.”, *Biotechnology advances*, v. 27, pp. 30 – 39.
- SINGH, R.P., PANDEY, K. J., REDDY, R. K., KUMAR, P. A., 2005 “An overview on the degradability of polymer nanocomposites.”, *Polymer degradation and stability*, v. 88, p. 234-250.
- SOLOMONS, T.W.G. E FRYHLE, C.B., 2004, “Química orgânica”, LTC, v. 1, pp. 389-390.
- STEINBÜCHEL, A., VALENTIN, H. E., 1995 “Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids.”, *FEMS Microbiology Letters*, v. 128, p. 219-228.
- STEINBÜCHEL, A., LÜTKE-EVERSLOH, T., 2003 “Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms.”, *Biochemical Engineering Journal*, v. 16, p. 81-96.
- STEINBÜCHEL, A., LÜTKE-EVERSOH, T., 2002 “Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant

polihydroxyalkanoates in microorganisms.”, *Process Biochemistry*, v. 16, pp. 81 – 96.

SUDESH, K., LEE, H.W., LOO, Y.C., NOMURA, T., C., 2008 “Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursor.”, *Bioresource Technology*.

SUDESH, K., BHUBALAN, K., SRIDEWI, N., 2006 “Degradation of commercially important polyhydroxyalkanoates in tropical mangrove ecosystem.”, *Polymer Degradation and Stability*, v. 91, p. 2931-2940.

SURIYAMONGKOL, P., WESELAKE, R., NARINE, S., MOLONEY, M., SHAH, S., “Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants – A review”, *Biotechnology advance*, v. 25, p. 148 – 175.

TANAKA, K., ISHIZAKI, A., KANAMARU, T., KAWANO, T., 1995, “Production of poly(D-3-hydroxybutyrate) from CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, and O<sub>2</sub> by high cell density autotrophic cultivation of *Alcaligenes eutrophus*”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 45, p. 268-275.

TOKIWA, Y., UGWU, U. C., 2007 “Biotechnological production of R-hydroxybutyric acid monomer.”, *Journal of Biotechnology*, v. 132, p. 264-272.

TSUGE, T., TANAKA, K., ISHIZAKI, A., 2001, “Developmentt of a novel method for deeding a mixture of L-lactic acid and acetic in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* for poly-D-3-hydroxybutyrate production”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 91, p. 545-550.

TSUGE, T., TANAKA, K., SHIMODA, M., ISHIZAKI, A., 1999, “Optimization of L-lactic acid feeding for production of poly-D-3-hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* in fed-batch culture”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 88, p. 404-409.

- TSUGE, T., 2002 “Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates.”, *Process Biochemistry*, v. 94, pp. 576 – 584.
- TSUGE, T., 2002 “Metabolic improvement and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 94, n. 6, p. 579-584.
- VALAPPIL, S.P., MISRA, S.K., BOCCACCINI, A.R., KESHAVARZ, T., BUCKE, C., ROY, I., 2007 “Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV .”, *Process Biochemistry*, v. 132, pp. 251 – 258.
- WATT, B. E., MORGAN, S. L., 1990 “2-Butenoic acid a chemical marker for polyhydroxybutyrate identified by pyrolysis-gas chromatography mass spectrometry in analyses of whole microbial cells.”, *Journal of analytical and applied pyrolysis*, v. 19, pp. 237 – 249.
- WEATHERBURN, M.W., 1967, “Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia”, *Analytical Chemistry*, v. 39, pp. 971-974.
- YAN, Q., DU, G., CHEN J., 2003, “ Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with continuous feeding of mixed organic acids as carbon sources by *Ralstonia eutropha*”, *Process Biochemistry*, v. 39, p. 387-391.
- ZEHNDER, J.B. A., HANY, R., FLEISCHMANN, T., HESSELMANN, P.X. R., 1998 “Determination of polyhydroxyalkanoates in activated sludge by ion chromatographic and enzymatic methods.”, *Journal of Microbiological Methods*, v. 31, p. 111- 119.
- YU., J., SI, Y., WONG, W., K., W., 2001 “Kinetics modeling of inhibition and utilization of mixed volatile fatty acids in the formation of polyhydroxyalkanoates by *Ralstonia eutropha*.”, *Process Biochemistry*, v. 37, pp. 731 – 738.

ZENG, A.-P., BIEBL, H., SCHLIEKER, H., DECKWER, W.-D, 1993, "Pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: Regulation of reducing equivalent balance and product formation", *Enzyme Microbial Technological*, v. 15, pp. 770-779.

ZINN, M., WITHOLT, B., EGLI, T., 2001 "Occurrence synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate.", *Advanced Drug Delivery Reviews* , v. 53, pp. 5 – 21.

# Apêndice

## 1.0 Apêndice

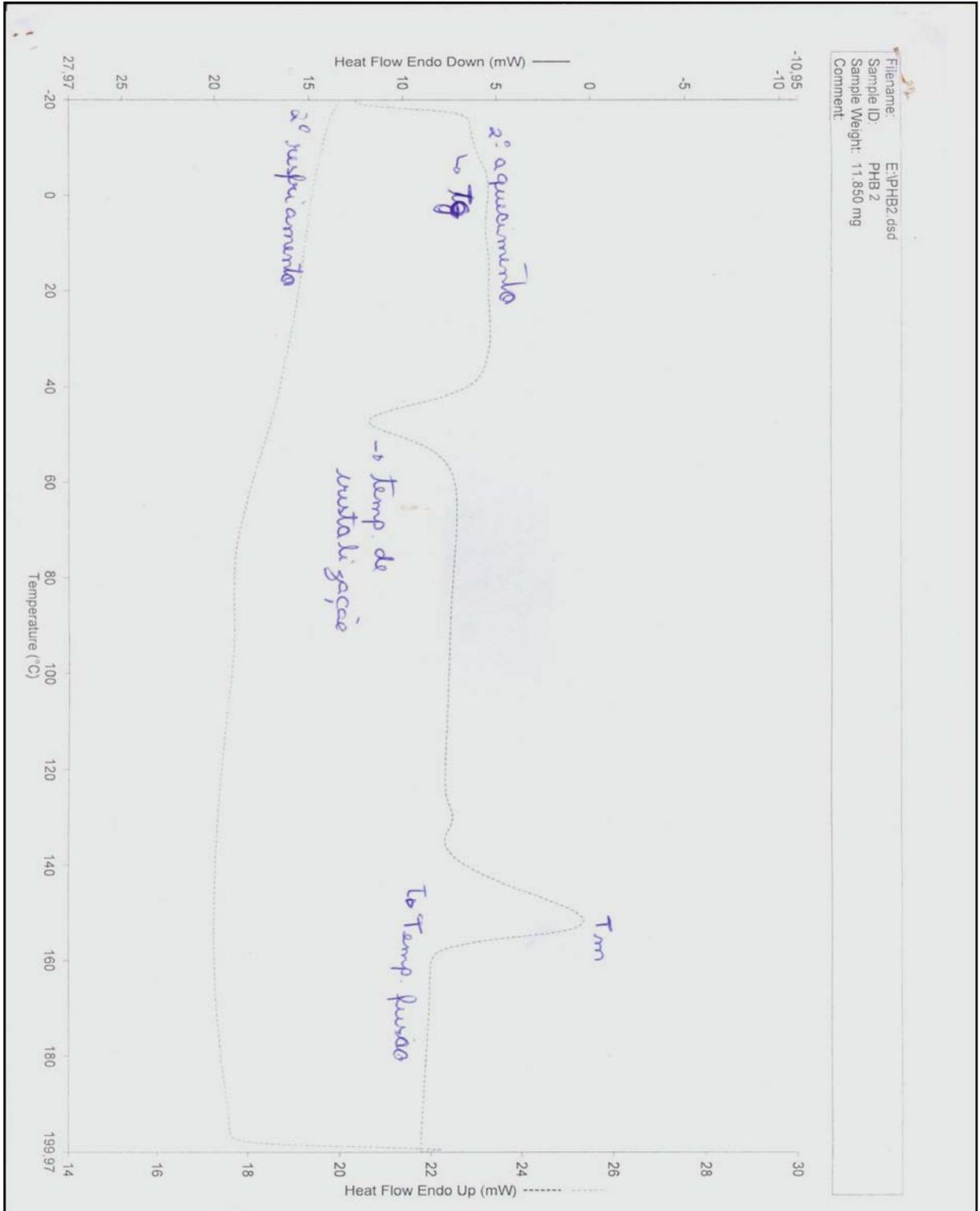


Figura 1: Análise térmica de DSC da amostra de P(3HB) extraída das massas celulares.



**Figura 2:** Análise térmica de DSC do P(3HB).

## 2.0 Apêndice

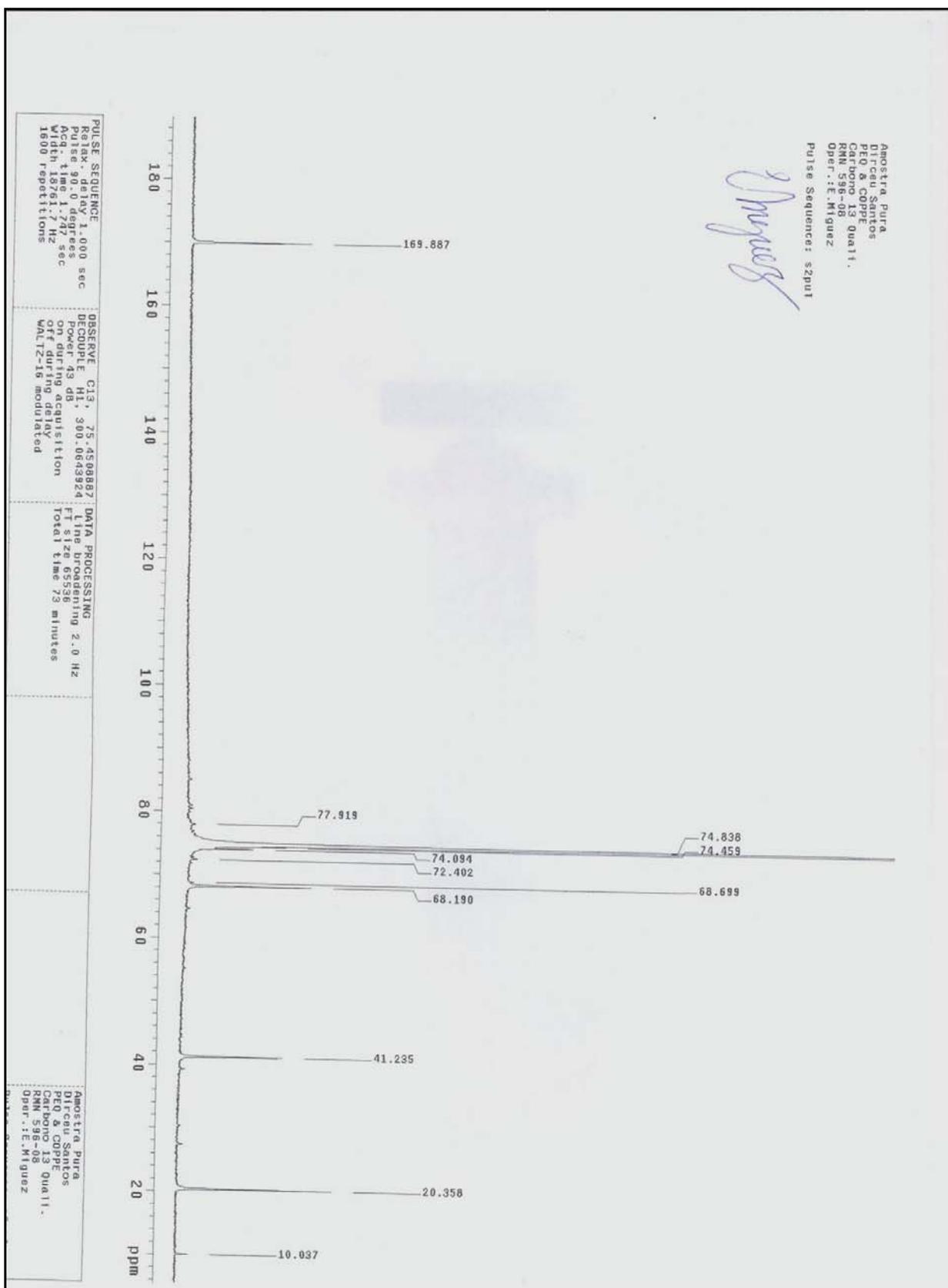
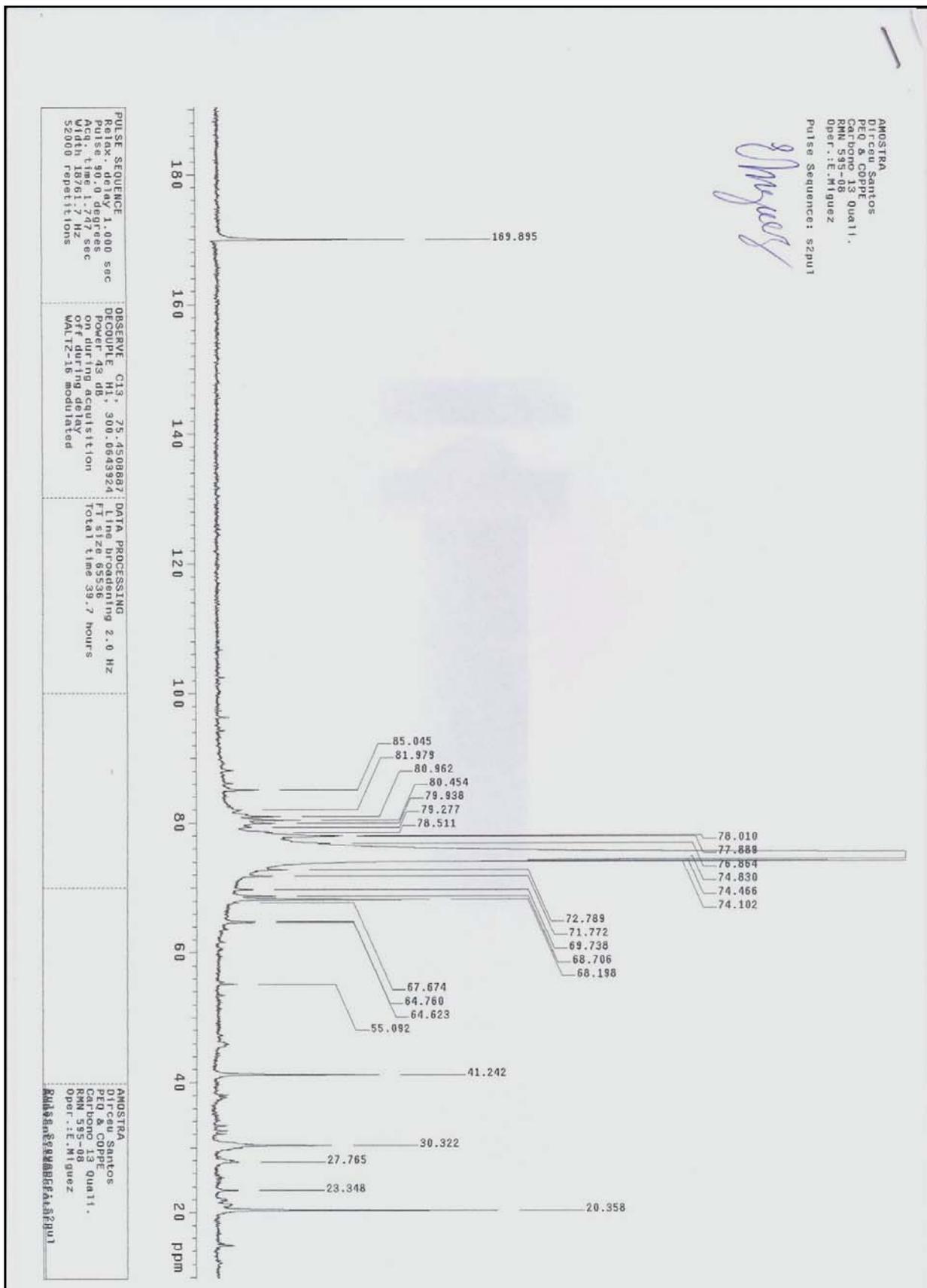
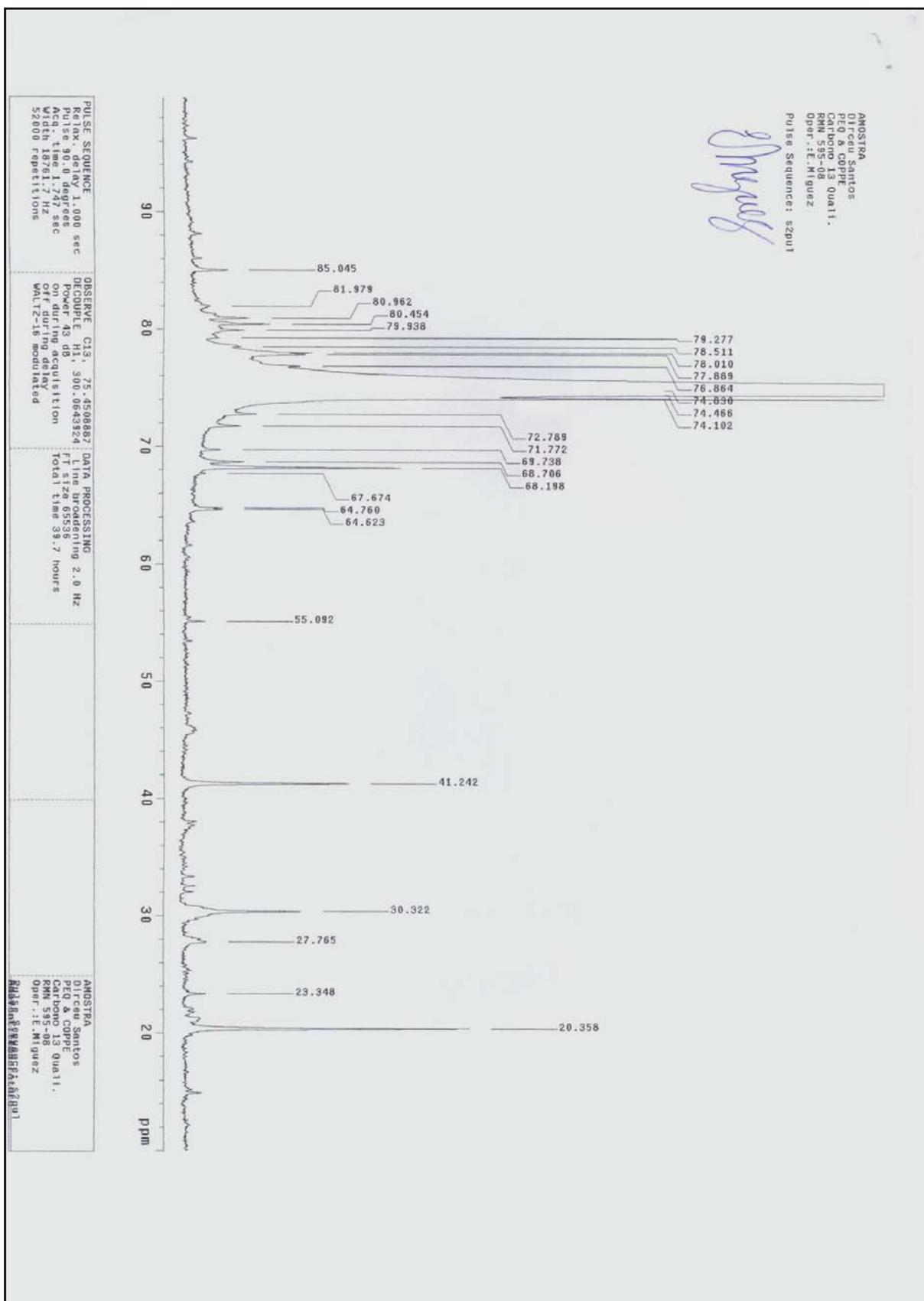


Figura 3: Análise de RMN do P(3HB) padrão.



**Figura 4:** Análise de RMN do P(3HB) extraído das massas celulares.



**Figura 5:** Análise de RMN do P(3HB) extraído das massas celulares na faixa de 20 a 90 ppm.