



UNIVERSIDADE FEDERAL
DE SANTA CATARINA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E DEGRADAÇÃO DE P(3HB)
POR *Cupriavidus necator*, UTILIZANDO GLICEROL COMO
SUBSTRATO**

GIANNINI PASIZNICK APATI

**FLORIANÓPOLIS
2012**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Giannini Pasiznick Apati

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E DEGRADAÇÃO DE P(3HB) POR
Cupriavidus necator, UTILIZANDO GLICEROL COMO
SUBSTRATO

Tese submetida ao Programa de
PósGraduação em Engenharia
Química da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Doutor em Engenharia
Química

Orientador: Dr. Agenor Furigo
Júnior

Co-orientadora: Dra. Ana Paula
Testa Pezzin

Co-orientadora: Dra. Andréa Lima
dos Santos Schneider

Florianópolis
2012

Síntese, Caracterização e Degradação de P(3HB) por *Cupriavidus necator*, Utilizando Glicerol como Substrato

por

Giannini Pasiznick Apati

Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Química**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.
Orientador

Prof.^a Dr.^a Ana Paula Testa Pezzin
coorientadora

Prof.^a Dr.^a Andréa Lima dos Santos Schneider
coorientadora

Prof. Dr. Ricardo Antonio Francisco Machado
Coordenador

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Gláucia Maria Falcão de Aragão

Prof.^a Dr.^a Marcia Margarete Meier

Dr.^a Morgana Zimmermann

Prof. Dr. Ozair Souza

Prof.^a Dr.^a Regina Maria Miranda Gern

Florianópolis, 20 de dezembro de 2012

Dedico este trabalho a minha filha
Giovanna, que passou a existir no
meio dessa jornada e que hoje é a
inspiração de onde tiro forças para
construir nossa estrada.
E aos meus pais Sandra e Carlinhos,
minha avó Terezinha e meu irmão
Carlos que estiveram sempre do meu
lado dando apoio para a conclusão de
mais essa etapa.

AGRADECIMENTOS

Certamente essa é a parte mais fácil e ao mesmo tempo mais difícil para se escrever na tese. A mais fácil porque não precisa consultar a literatura especializada, nem realizar experimentos no laboratório e discutir resultados, mas também a mais difícil porque nesse momento dá um medo enorme de esquecer alguém, pois foram muitas as pessoas que me ajudaram as quais sou imensamente grata.

Primeiramente quero agradecer aos meus orientadores professor Agenor Furigo Junior e as professoras Ana Paula Testa Pezzin e Andréa Schneider que foram muito mais do que orientadores, foram meus amigos e me transmitiram seu conhecimento tão vasto com paciência e sabedoria.

Aos meus alunos de IC Maikon Kelbert e Bruna Sombrio que me ajudaram incondicionalmente, participando de todas as etapas da tese, inclusive virando as noites comigo no laboratório.

Aos colegas do grupo de materiais da Univille (Michele Formolo Garcia, Theodoro Marcel Wagner, Luciana Prazeres Mazur) que me ajudaram nas análises e discussões de resultados.

Aos nossos parceiros que prontamente nos atenderam quando precisamos realizar alguma análise: prof. Gean Salmoria da UFSC que disponibilizou as análises de DRX e MEV; prof. Sérgio Pezzin da UDESC que disponibilizou as análises de FTIR; profa. Sandra Einloft da (PUCRS) que forneceu o glicerol bruto utilizado em alguns experimentos.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório há anos que muitas vezes ouviram os desabafos e incentivaram para não desistir, Millena Montagnoli, Beatriz Torrens, Michele Garcia, Leslie Ecker, obrigada meninas!

Aos meus familiares, minha mãe que sempre quis ter uma filha doutora, meu pai, meu irmão e minha avó que me apoiaram em tudo, desde logisticamente com as idas e vindas à Florianópolis, noites no laboratório, aliando tudo com aulas, cuidar da Giovanna, levá-la na escola, e por aí vai. Obrigada por tudo mesmo.

Ao meu amore Cristiano Boccacino, que chegou na metade dessa jornada e precisou se adaptar a correria que é um doutorado, com a ausência da namorada, mas que soube me dar seu abraço nas horas mais difíceis e se interessou em saber tudo sobre produção de polímeros biodegradáveis.

Ao Edvilson que prontamente nos atende e ajudou a resolver várias coisas facilitando o caminho Joinville-Florianópolis.

Ao professor Luismar Marques Porto que sempre esteve disposto a tirar algumas dúvidas e discutiu muitas ideias no decorrer o doutorado.

A UNIVILLE que acolheu o projeto e financiou a pesquisa.

A todos os membros da banca que aceitaram avaliar este trabalho e contribuir com suas tão preciosas sugestões.

Agradeço ainda a todos os meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, ajudando, mesmo que indiretamente, a construir minha história. E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Meu muito obrigada a todos, de coração!

RESUMO

O poli(3-hidroxiбутирато) - P(3HB), é um poliéster natural e biodegradável, produzido por cultura bacteriana, sendo considerado um atrativo substituto para os polímeros petroquímicos. O glicerol, por sua vez, que teve sua disponibilidade no mercado ampliada em decorrência da política nacional de estímulo à adição de biodiesel nos combustíveis fósseis, pode ser utilizado para diversas finalidades. Dentre elas, destaca-se seu uso como fonte de carbono no cultivo de micro-organismos. Diante da disponibilidade de glicerol, objetivou-se neste trabalho utilizá-lo como fonte de carbono adicional na produção de P(3HB). Foram realizados ensaios preliminares nos quais foi avaliada a possibilidade do uso do glicerol proveniente da produção do biodiesel na biossíntese do P(3HB). Em seguida, foram realizados ensaios planejados por meio de um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 com 3 pontos centrais no qual foram avaliadas a influência da temperatura e das concentrações de açúcar invertido e glicerol no crescimento de *Cupriavidus necator*, bem como na produção e acúmulo do polímero pela célula, ensaio este que foi em seguida validado em triplicata avaliando sua cinética. A melhor condição validada teve sua escala ampliada para biorreator de 2 L, também com avaliação cinética e extração dos filmes para a sua caracterização físico-química, térmica e mecânica. E, finalmente, foram realizados os ensaios de biodegradação em solo e exposição em câmara de envelhecimento acelerado, com avaliação do material degradado. Nos ensaios preliminares constatou-se que o glicerol bruto poderia ser utilizado como fonte de carbono adicional ao meio de cultivo de *C. necator*. Os resultados do DCCR revelaram que o aumento da temperatura levou a um incremento na produção e no acúmulo de P(3HB) e que, quando foram utilizados 15 g L^{-1} de glicerol, chegou-se a resultados de acúmulo 15 % superiores, porém não considerados como estatisticamente significativos. O modelo obtido no DCCR foi validado para todas as condições para o acúmulo percentual de P(3HB) e para a produção de polímero diferiu em 3 % do valor experimental obtido para a condição a $38 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 g L^{-1} de açúcar invertido e 15 g L^{-1} de glicerol, para as demais condições testadas o modelo foi validado. Em biorreator, foram realizados cinco ensaios, sendo que para os ensaios com adição de glicerol bruto como substrato ou cosubstrato não houve crescimento ou produção de P(3HB) viável para extração. Na caracterização dos polímeros sintetizados em biorreator com e sem adição de glicerol puro, verificou-se que o uso do glicerol não modificou as propriedades dos filmes, mas foi possível

afirmar que os polímeros obtidos e extraídos nesse trabalho eram mesmo o P(3HB). Em solo, as amostra degradaram em 35 dias, enquanto na exposição dos filmes à câmara de envelhecimento acelerado notou-se maior estabilidade das amostras o que permitiria a aplicação do polímero no ambiente, sem que ele se degradasse.

Palavras-chave: Poli(3-hidroxiбутирато), *Cupriavidus necator*, glicerol.

ABSTRACT

Poly(3-hydroxybutyrate) - P(3HB) is a natural, biodegradable polyester, produced by bacterial fermentation, and considered an attractive replacement for petrochemical polymers. Glycerol had expanded its availability in the market due to the national policy of encouraging the addition of biodiesel in fossil fuels, the glycerol can be used for several purposes. Among them, its use as a carbon source for the cultivation of microorganisms has been highlighted. Through the availability of glycerol, this study aimed to use it as an additional carbon source on the production of P(3HB). First of all, preliminary tests were conducted to evaluate the possibility of the use of glycerol from the biodiesel production in the biosynthesis of P(3HB). Then, tests were conducted planned by a central composite rotatable design (CCRD) 2^3 with three central points in order to evaluate the influence of the temperature and the concentrations of inverted sugar and glycerol on *Cupriavidus necator* growth, as well as the production and accumulation of the polymer into the cell. The experiments were made in triplicate and the kinetics were evaluated. The best condition of the process had their range expanded to 2 L bioreactor. The kinetic were evaluated and the films obtained had its physical-chemical, thermal and mechanical properties evaluated. Finally, biodegradation in soil assays were performed and exposure chamber accelerated aging was performed, with evaluation of the degraded material. In preliminary tests it was found that crude glycerol could be used as an additional carbon source to the culture medium of *C. necator*. The results of the CCRD revealed that the increase of the temperature led to an increase in the production and accumulation of P(3HB) and when 15 g L^{-1} of glycerol were added to the medium, an accumulation of 15% was reached, but not considered as statistically significant. The model obtained in CCRD was validated for all conditions for the accumulation percentage of P (3HB) and the polymer production differed in 3 % of the value obtained for the experimental condition at $38 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 g L^{-1} of inverted sugar and 15 g L^{-1} of glycerol, for the other conditions tested the model was validated. Five tests were performed in bioreactor, and no growth or production of P (3HB) viable for extraction was identified for assays with crude glycerol as substrate or co-substrate. In the characterization of the polymers synthesized in bioreactor with and without addition of pure glycerol, it was found that the use of glycerol did not modify the film properties, but it was possible to say that the polymers extracted were P(3HB). In soil, the samples degraded in 35 days, while the films that was exposed

at the accelerated aging chamber presented greater stability of the samples which would allow the application of the polymer in the environment without degradation.

Keywords: Poly(3-hydroxybutyrate), *Cupriavidus necator*, glycerol.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- Abs – absorvância
AI/SG – açúcar invertido / sem glicerol
AI/GP – açúcar invertido / glicerol puro
AI/GB – açúcar invertido / glicerol bruto
AI/GBm – açúcar invertido / glicerol bruto da rota metílica
AI/GBe – açúcar invertido / glicerol bruto da rota etílica
ATR – acessório de refletância total atenuada
DSC – calorimetria diferencial exploratória
FTIR – espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
3HV – 3-hidroxivalerato
3HA – 3-hidroxialcanoato
(3HB) – 3-hidroxibutirato
(4HB) – 4-hidroxibutirato
LCL – alcanoatos de cadeia longa
 M_w – massa molecular ponderal média
 M_n – massa molecular numérica média
 M_w/M_n – índice de polidispersividade
MEV - microscopia eletrônica de varredura
MM – meio mineral
MCL – alcanoatos de cadeia média
PHA – polihidroxialcanoatos
P(3HB) – poli(3-hidroxibutirato)
P(3HD) – poli(3-hidroxidecanoato)
P(3HH) – poli(3-hidroxihexanoato)
P(3HO) – poli(3-hidroxioctanoato)
PCL – poli(ϵ -caprolactona)
PLA – polilactídeo
P(3HB-*co*-3HV) – poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-valerato)
PVC – poli(cloreto de vinila)
PE – polietileno
PP – polipropileno
 $P_{P(3HB)}$ – produtividade em polímero ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) na fase de produção
 $P_{gP(3HB)}$ – produtividade global em polímero ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)
 P_{Xr} – produtividade global em célula ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)
SCL – alcanoatos de cadeia curta
 T_c – temperatura de cristalização ($^{\circ}\text{C}$)
 T_g – temperatura de transição vítrea ($^{\circ}\text{C}$)

T_m – temperatura de fusão ($^{\circ}\text{C}$)

TGA – análise termogravimétrica

T_{onset} – temperaturas de degradação ($^{\circ}\text{C}$)

$T_{\text{máx}}$ – temperatura máxima de degradação ($^{\circ}\text{C}$)

UV – ultravioleta

X_r – biomassa residual (g L^{-1})

X_t – biomassa total (g L^{-1})

$Y_{P(3HB)/S}$ – fator de conversão de substrato em polímero (g g^{-1})

$Y_{Xr/S}$ – fator de conversão de substrato em célula (g g^{-1})

μ_{Xr} – velocidade específica de crescimento (h^{-1})

ΔH_m – entalpia de fusão (J g^{-1})

χ_c – grau de cristalinidade (%)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula química estrutural dos polihidroxialcanoatos (PHAs) produzidos por bactérias (GOMES e BUENO NETTO, 1997; OJUMO <i>et al.</i> 2003).	38
Figura 2. Grânulos do polímero biodegradável P(3HB) no interior das bactérias (BRAUNEGG <i>et al.</i> , 1998).	39
Figura 3. Esquema da transesterificação de um triglicerídeo genérico com metanol. (Fonte: RINALDI <i>et al.</i> , 2007).	43
Figura 4. Aplicações do glicerol (Fonte: ARRUDA <i>et al.</i> , 2006).	46
Figura 5. Esquema do processo de biodegradação de materiais poliméricos (Adaptado de LUCAS <i>et al.</i> , 2008).	58
Figura 6. Dispositivo experimental de cultivo em biorreator.	65
Figura 7. Fluxograma do processamento das amostras para os ensaios conduzidos em frascos de Erlenmeyer.	66
Figura 8. Fluxograma do processamento das amostras para os ensaios conduzidos em biorreator.	67
Figura 9. Cuba de vidro para formação do filme por evaporação lenta de solvente.	73
Figura 10. Ensaio de biodegradação em solo.	77
Figura 11. Foto das amostras expostas na câmara de envelhecimento acelerado.	78
Figura 12. Separação das fases na extração do glicerol de biodiesel.	80
Figura 13. Superfícies de resposta para produção de P(3HB) em relação à concentração de açúcar invertido (g L^{-1}) e à temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$). (a) sem glicerol e (b) concentração de glicerol igual a 15 g L^{-1}	85
Figura 14. Superfícies de resposta para o acúmulo de P(3HB) (%) em relação à concentração de açúcar invertido (g L^{-1}) e a temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$). (a) sem glicerol e (b) concentração de glicerol igual a 15 g L^{-1}	88
Figura 15. Cinética, em frascos agitados, do crescimento de <i>Cupriavidus necator</i> DSM 545 e produção de P(3HB) a 38°C , utilizando 30 g L^{-1} de açúcar invertido como substrato. (●) biomassa total (X_t), (△) produção de P(3HB), (---) biomassa residual (X_r), (□) concentração de açúcar invertido (Açúcar).	90

Figura 16. Cinética de crescimento de <i>Cupriavidus necator</i> DSM 545 e produção de P(3HB) a 38 °C, utilizando 15 g L ⁻¹ de açúcar invertido e 15 g L ⁻¹ de glicerol como substrato. (●) biomassa total (Xt), (△) produção de P(3HB), (---) biomassa residual (Xr), (□) concentração de açúcar invertido (Açúcar), (■) concentração de glicerol.	92
Figura 17. Cinética de crescimento de <i>Cupriavidus necator</i> DSM 545 e produção de P(3HB) em frascos agitados a 38 °C, utilizando açúcar invertido 30 g L ⁻¹ e 15 g L ⁻¹ de glicerol como substrato. (●) biomassa total (Xt), (△) produção de P(3HB), (---) biomassa residual (Xr), (□) concentração de açúcar invertido (Açúcar), (■) concentração de glicerol.	93
Figura 18. Comparativo entre os valores preditos pelo modelo para a produção de P(3HB) e acúmulo percentual do polímero comparado aos valores obtidos experimentalmente no cultivo de <i>C. necator</i> a 38 °C variando as concentrações de açúcar invertido e glicerol.	95
Figura 19. Cinética de crescimento de <i>Cupriavidus necator</i> em biorreator e produção de P(3HB) a 38 °C, utilizando 30 g L ⁻¹ de açúcar invertido e 15 g L ⁻¹ de glicerol como substrato (AI/GP). (●) biomassa total (Xt), (△) produção de P(3HB), (---) biomassa residual (Xr), (■) concentração de açúcar invertido (Açúcar), (□) concentração de glicerol.	97
Figura 20. Cinética de crescimento de <i>Cupriavidus necator</i> em biorreator e produção de P(3HB) a 38 °C, utilizando 30 g L ⁻¹ de açúcar invertido como substrato (AI/SG). (●) biomassa total (Xt), (△) produção de P(3HB), (---) biomassa residual (Xr), (■) concentração de açúcar invertido (Açúcar), (□) concentração de glicerol.	98
Figura 21. Espectros de FTIR para os filmes de P(3HB): a) AI/GP; b) AI/SG.....	104
Figura 22. Difrátogramas de raios-x dos P(3HB) sintetizados: a) com glicerol puro (AI/GP); b) sem glicerol (AI/SG).	106
Figura 23. Curvas de TGA do P(3HB) sintetizados com glicerol puro (AI/GP) e sem glicerol (AI/SG): a) termogravimetria (TG); b) termogravimetria derivada (DTG).	108
Figura 24. Mecanismo de degradação térmica do P(3HB): a) cisão de cadeia aleatória entre 170 a 200 °C; b) quebra dos oligômeros de P(3HB) entre 200 a 300 °C. Fonte: MOUSAVIOUN <i>et al.</i> , 2012.....	109

Figura 25. Curvas de DSC para os filmes de P(3HB) sintetizados com glicerol puro (AI/GP) e sem glicerol (AI/SG): a) primeiro aquecimento; b) segundo aquecimento.....	111
Figura 26. Resultados mecânicos dos filmes de P(3HB) sintetizados com glicerol puro (AI/GP) e sem glicerol (AI/SG): a) módulo de Young; b) alongamento na ruptura; c) tensão máxima.....	113
Figura 27. Fotos das amostras AI/GP e AI/SG após 0, 7, 14, 21 e 28 dias de biodegradação em solo.	117
Figura 28. Micrografias de MEV (100x) das amostras AI/GP e AI/SG após 0, 7, 14, 21 e 28 dias de biodegradação em solo.....	119
Figura 29. Micrografias de MEV (1000x) das amostras AI/SG e AI/GP após 0, 7, 14, 21 e 28 dias de biodegradação em solo.....	120
Figura 30. Foto da amostra de filme de P(3HB) utilizado para o teste de biodegradação em solo após ser desenterrada.....	121
Figura 31. Gráfico da redução de massa em função do tempo de biodegradação em solo para as amostras AI/GP e AI/SG.	122
Figura 32. Curvas de TGA para os polímeros AI/GP e AI/SG em função do tempo de biodegradação: a) AI/GP termogravimetria (TG); b) AI/GP derivada primeira da curva termogravimétrica (DTG); c) AI/SG termogravimetria (TG); d) AI/SG derivada primeira da curva termogravimétrica (DTG).	123
Figura 33. Curvas de DSC para os polímeros AI/GP e AI/SG em função do tempo de biodegradação: a) AI/GP primeiro aquecimento; b) AI/GP segundo aquecimento; c) AI/SG primeiro aquecimento; d) AI/SG segundo aquecimento.	125
Figura 34. Difractogramas de DRX para os polímeros sintetizados em função do tempo de biodegradação: a) AI/GP b) AI/SG.....	128
Figura 35. Espectro de FTIR das amostras antes e após 35 dias de degradação em solo. a) AI/GP e b) AI/SG.	130
Figura 36. Gráfico da redução de massa em função do tempo de envelhecimento acelerado para as amostras AI/GP e AI/SG.	132
Figura 37. Cromatograma do glicerol proveniente da extração de biodiesel de rota metálica, sintetizado na UNIVILLE.	147
Figura 38. Cromatograma do glicerol proveniente da extração de biodiesel de rota metálica, sintetizado na PUCRS.	148

Figura 39. Cromatograma do glicerol proveniente da extração de biodiesel de rota etflica, sintetizado na PUCRS. 149

Figura 40. Gráficos utilizados para cálculos cinéticos do ensaio em frascos agitados a 150 min^{-1} e $38 \text{ }^\circ\text{C}$ com 30 g L^{-1} de açúcar invertido. (a) cálculo do fator de conversão de substrato em célula, (b) cálculo do fator de conversão de substrato em produto, (c) cálculo da produtividade em célula, (d) cálculos da produtividade global em polímero e da produtividade em polímero na fase de produção e (e) cálculos da velocidade específica de crescimento. 150

Figura 41. Gráficos utilizados para cálculos cinéticos do ensaio em frascos agitados a 150 min^{-1} e $38 \text{ }^\circ\text{C}$ com 15 g L^{-1} de açúcar invertido e 15 g L^{-1} de glicerol. (a) cálculo do fator de conversão de substrato em célula, (b) cálculo do fator de conversão de substrato em produto, (c) cálculo da produtividade em célula, (d) cálculos da produtividade global em polímero e da produtividade em polímero na fase de produção e (e) cálculos da velocidade específica de crescimento..... 151

Figura 42. Gráficos utilizados para cálculos cinéticos do ensaio em frascos agitados a 150 min^{-1} e $38 \text{ }^\circ\text{C}$ com 30 g L^{-1} de açúcar invertido e 15 g L^{-1} de glicerol. (a) cálculo do fator de conversão de substrato em célula, (b) cálculo do fator de conversão de substrato em produto, (c) cálculo da produtividade em célula, (d) cálculos da produtividade global em polímero e da produtividade em polímero na fase de produção e (e) cálculos da velocidade específica de crescimento. 152

Figura 43. Gráficos utilizados para cálculos cinéticos do ensaio em biorreator a $38 \text{ }^\circ\text{C}$ com 30 g L^{-1} de açúcar invertido e 15 g L^{-1} de glicerol (AI/GP). (a) fator de conversão de substrato em célula, (b) fator de conversão de substrato em produto, (c) produtividade em célula, (d) produtividade global em polímero e da produtividade em polímero na fase de produção, (e) velocidade específica de crescimento $\mu_{\text{máx}}$, (f) velocidade específica de produção de P(3HB) e (g) velocidade específica de consumo do substrato. 153

Figura 44. Gráficos utilizados para cálculos cinéticos do ensaio em biorreator a $38 \text{ }^\circ\text{C}$ com 30 g L^{-1} de açúcar invertido e sem glicerol (AI/SG). (a) cálculo do fator de conversão de substrato em célula, (b) cálculo do fator de conversão de substrato em produto, (c) cálculo da produtividade em célula, (d) cálculos da produtividade global em polímero e da produtividade em polímero na fase de produção, (e) cálculo da velocidade específica de crescimento $\mu_{\text{máx}}$, (f) velocidade

específica de produção de P(3HB) e (g) velocidade específica de consumo do substrato.....154

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados obtidos por alguns autores utilizando glicerol como fonte de carbono, diferentes fontes de nitrogênio, diferentes micro-organismos e diferentes escalas de produção de P(3HB).	48
Tabela 2. Composição do meio mineral (MM).	60
Tabela 3. Composição da solução de oligoelementos.	60
Tabela 4 Condições experimentais, com variáveis codificadas e reais: temperatura de cultivo, concentrações de glicerol e açúcar invertido utilizadas no DCCR.....	63
Tabela 5. Volumes de água, amostra e reagentes a serem utilizados na dosagem de nitrogênio.	70
Tabela 6. Resultados preliminares do cultivo de <i>C. necator</i> em glicerol bruto e purificado. Concentração celular (X_t), concentração de P(3HB) e acúmulo percentual de P(3HB).	81
Tabela 7. Condições experimentais dos ensaios delineados e as respostas em X_t ($g L^{-1}$), X_r ($g L^{-1}$) e P(3HB) ($g L^{-1}$).	82
Tabela 8. Análise de variância (ANOVA) dos valores obtidos para a produção de P(3HB).	83
Tabela 9. Análise de variância (ANOVA) demonstrando a variação significativa do acúmulo percentual de P(3HB) no interior das células de <i>C. necator</i>	86
Tabela 10. Valores de biomassa, concentração de P(3HB), acúmulo percentual de P(3HB), produtividade em células, produtividade em P(3HB), fatores de conversão de substrato em células e substrato em P(3HB) obtidos no cultivo de <i>C. necator</i> em frascos agitados utilizando diferentes concentrações da fonte de carbono no meio. Os valores representam as médias \pm erro padrão	94
Tabela 11. Valores de biomassa, concentração de P(3HB), acúmulo percentual de P(3HB), produtividade em células, produtividade em P(3HB), velocidades específicas de crescimento, produção de P(3HB) e consumo de substrato, fatores de conversão de substrato em células e substrato em P(3HB) nos cultivos em biorreator na presença ou ausência de glicerol.	99

Tabela 12. Relação de picos características no espectro de Infravermelho para os polímeros obtidos com glicerol puro (AI/GP) e sem glicerol (AI/SG), comparados com a literatura.	103
Tabela 13. Dados de grau de cristalinidade para os polímeros sintetizados com glicerol puro (AI/GP) e sem glicerol (AI/SG), determinados por difração de raios-X.	107
Tabela 14. Dados Tonset e $T_{máx}$ obtidos das curvas de TG e DTG para os polímeros sintetizados com glicerol puro (AI/GP) e sem glicerol (AI/SG).	109
Tabela 15. Dados de temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade (α_c) obtidos das curvas de DSC para os polímeros sintetizados com glicerol puro (AI/GP) e sem glicerol (AI/SG).	112
Tabela 16. Temperatura de degradação (Tonset), temperatura máxima de degradação ($T_{máx}$) e percentual de perda de massa determinados por TGA para as amostras AI/GP e AI/SG em função do tempo de biodegradação.	124
Tabela 17. Dados de temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão cristalina (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade (α_c) determinados por DSC para as amostras AI/GP e AI/SG em função do tempo de biodegradação.	126
Tabela 18. Dados de grau de cristalinidade para os polímeros sintetizados com glicerol puro (AI/GP) e sem glicerol (AI/SG), determinados por difração de raios-X em função do tempo de biodegradação.	129

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	33
1 OBJETIVOS	35
1.1 Objetivo Geral	35
1.2 Objetivos Específicos	35
2 REVISÃO DE LITERATURA	37
2.1 Polihidroxicanoatos - PHAs	37
2.1.1 Poli(3-hidroxi butirato)- P(3HB)	38
2.2 Cupriavidus necator	40
2.3 Síntese de biodiesel	42
2.4 Glicerol	44
2.5 Estado da arte	47
2.6 Biodegradação de polímeros	54
2.7 Processo de biodegradação de materiais poliméricos	56
3 MATERIAL E MÉTODOS	59
3.1 Micro-organismo	59
3.1.1 Meios de cultivo	59
3.2 Fontes do glicerol	61
3.3 Condições de cultivo	61
3.3.1 Culturas iniciais	61
3.3.2 Ensaio realizados em frascos agitados	62
3.3.2.1 Ensaio de verificação da viabilidade de uso do glicerol como substrato ou cosubstrato para <i>C. necator</i>	62
3.3.2.2 Ensaio de otimização das condições de cultivo de <i>C. necator</i> para produção de P(3HB)	62
3.3.2.3 Validação do delineamento composto central rotacional (DCCR)	63
3.3.3 Ensaio realizados em biorreator	64
3.4 Técnicas analíticas para acompanhamento do cultivo	65
3.4.1 Processamento das amostras	65

3.4.1.1 Ensaio em frascos agitados.....	65
3.4.1.2 Ensaio em biorreator.....	66
3.4.2 Biomassa.....	67
3.4.3 Determinação da concentração de P(3HB) (metanólise)	68
3.4.3.1 Metanólise.....	68
3.4.3.2 Cromatografia gasosa.....	68
3.4.4 Determinação da concentração de substrato	69
3.4.5 Determinação do teor de nitrogênio.....	69
3.5 Metodologia utilizada para determinação dos parâmetros cinéticos.....	70
3.5.1 Fatores de conversão.....	70
3.5.2 Produtividade global	71
3.5.3 Produtividade da fase de produção de P(3HB)	71
3.5.4 Velocidades específicas de crescimento celular, formação de produto e consumo de substrato.....	71
3.6 Recuperação do P(3HB) produzido.....	72
3.6.1 Extração de P(3HB)	72
3.6.2 Purificação dos filmes de P(3HB).....	73
3.7 Caracterização do P(3HB) sintetizado por <i>Cupriavidus necator</i> ..	73
3.7.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	74
3.7.2. Difractometria de raios-X (DRX)	74
3.7.3 Análise termogravimétrica (TGA)	74
3.7.4 Calorimetria diferencial exploratória (DSC).....	74
3.7.5 Propriedades mecânicas sob tração.....	75
3.7.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	76
3.8 Ensaio de biodegradação	76
3.8.1 Preparação do solo	76
3.8.2 Ensaio de biodegradação	77
3.9 Degradação em câmara de envelhecimento acelerado.....	78

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4.1 Síntese do biodiesel e extração do glicerol	79
4.2 Ensaios em frascos agitados	80
4.2.1 Ensaios preliminares	80
4.2.2 Ensaios delineados	82
4.3 Validação do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	89
4.3 Ensaios em biorreator	96
4.4 Caracterização dos filmes de P(3HB) sintetizados em biorreator	101
4.4.1. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	102
4.4.2. Difractometria de raios-X (DRX)	105
4.4.3. Análise termogravimétrica (TGA)	107
4.4.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	110
4.4.5. Ensaio mecânico sob tração	112
4.5 Biodegradação em solo	115
4.5.1 Análise visual	115
4.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	118
4.5.3 Análise gravimétrica	121
4.5.4 . Análise termogravimétrica (TGA)	122
4.5.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	124
4.5.6 Difractometria de raios-X (DRX)	126
4.5.7 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	129
4.6 Degradação em câmara de envelhecimento acelerado	131
CONCLUSÕES	133
REFERÊNCIAS	135
Anexo 1 – Cromatogramas dos gliceróis provenientes dos biodieseis...	147
Anexo 2 – Gráficos utilizados para cálculos cinéticos	150

INTRODUÇÃO

Os materiais plásticos têm se tornado parte integrante da vida contemporânea e têm sido usados intensivamente devido às suas características, tais como, durabilidade, facilidade de processamento e resistência à biodegradação. Esta última propriedade, aliada ao fato da maioria dos plásticos convencionais serem produzidos a partir de derivados do petróleo são motivos preocupantes. Os plásticos petroquímicos levam várias décadas para serem degradados. Além disso, os plásticos reciclados geralmente apresentam propriedades inferiores, são utilizados para aplicações menos nobres e sua incineração pode liberar componentes tóxicos, como o caso do poli(cloreto de vinila) (PVC), por exemplo, que libera ácido clorídrico.

Em resposta a estes problemas e do efeito prejudicial da disposição destes plásticos no meio ambiente, vem aumentando consideravelmente o interesse pelo desenvolvimento dos materiais plásticos biodegradáveis, como os polihidroxialcanoatos (PHAs), polilactídeos, poliésteres alifáticos, polissacarídeos e blends destes. Os PHAs são substitutos atrativos para os plásticos petroquímicos convencionais, uma vez que eles apresentam propriedades físicas similares a vários termoplásticos e elastômeros. Adicionalmente, os PHAs podem ser completamente biodegradados por uma variedade de micro-organismos num período máximo de 1 ano. Os PHAs são naturalmente sintetizados por inúmeros organismos (desde bactérias a plantas) utilizando recursos renováveis. Em bactérias, os PHAs são frequentemente produzidos sob condições de crescimento desbalanceadas, sendo acumulados na forma de grânulos no citoplasma, como carbono intracelular e compostos de armazenamento de energia. Até o momento, aproximadamente 150 constituintes da classe dos PHAs já foram identificados. Essa diversidade de monômeros fornece um amplo espectro de polímeros com propriedades físicas e mecânicas diversificadas, desde polímeros cristalinos rígidos até borrachas elastoméricas, dependendo da unidade monomérica incorporada. O tipo da fonte de carbono utilizada como substrato não somente afeta o polímero produzido em termos das propriedades físico-químicas e mecânicas, como também seu rendimento e composição monomérica.

O alto custo de produção dos PHAs, entretanto, tem limitado seu uso para a grande maioria das aplicações. Como cerca de 45 % do custo total de produção pode ser atribuído à matéria prima, na qual a fonte de carbono é a mais consumida, torna-se interessante o desenvolvimento de

processos de produção baseados em fontes de carbono residuais. Por outro lado, o crescimento da produção de biodiesel, na qual o principal coproduto é o glicerol, tem gerado um excedente deste composto levando, conseqüentemente, a um decréscimo no seu preço de venda. Os produtores de biodiesel de grande porte refinam o seu glicerol bruto para eliminar as impurezas (metanol, sais e ácido graxos) e o destinam às indústrias de alimentos, farmacêutica e cosméticos. Por outro lado, os pequenos e médios produtores de biodiesel que não podem arcar com os custos de purificação do glicerol gerado, necessitam destiná-lo a uma aplicação de maior valor agregado a fim de reduzir os custos de manufatura desse biocombustível. Assim, uma alternativa interessante para utilização do glicerol é a sua bioconversão em produtos de alto valor agregado por meio de processos microbiológicos.

Neste trabalho foi realizado um estudo da biossíntese de P(3HB) por *Cupriavidus necator* utilizando glicerol bruto e purificado como substrato e cosubstrato. Seu caráter inovador está no fato de que foram avaliadas, além das características térmicas, as propriedades mecânicas desse polímero, bem como a biodegradação em solo, verificando a influência da presença do glicerol no meio de cultivo sobre as propriedades supra citadas. Além disso, avaliou-se a influência da temperatura de cultivo (chegando até 38 °C) sobre a produção do polímero, bem como as concentrações de açúcar invertido e glicerol e também as interações dessas variáveis nesse trabalho, uma vez que temperaturas mais elevadas não haviam sido testadas.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência do uso do glicerol como substrato na produção de P(3HB) por *Cupriavidus necator* sobre as propriedades e a biodegradabilidade em solo do polímero.

1.2 Objetivos Específicos

- Realizar ensaios preliminares da viabilidade de biosíntese de P(3HB) a partir de glicerol obtido da síntese de biodiesel como substrato ou cosubstrato;
- Avaliar o uso do glicerol purificado e do glicerol bruto (subproduto da manufatura de biodiesel) na produção de P(3HB);
- Avaliar o efeito da temperatura de cultivo e das concentrações de glicerol e de açúcar invertido no meio na síntese de P(3HB) por *Cupriavidus necator*, em frascos agitados, por meio de um planejamento experimental;
- Validar o modelo proposto pelo planejamento experimental com definição dos parâmetros cinéticos;
- Avaliar a cinética de crescimento e produção de P(3HB) por *Cupriavidus necator* em biorreator utilizando as melhores condições obtidas pelo planejamento experimental;
- Caracterizar o polímero obtido em relação as suas propriedades físico-químicas, térmicas e mecânicas;
- Estudar a biodegradabilidade em solo dos filmes poliméricos de P(3HB);
- Avaliar a estabilidade dos filmes em câmara de envelhecimento acelerado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os polímeros convencionais ou petroquímicos apresentam uma taxa de biodegradação extremamente baixa e em decorrência disso vem causando sérios problemas ambientais devido ao seu acúmulo como resíduo sólido. Uma alternativa seria a substituição destes por polímeros biodegradáveis. Um biopolímero muito estudado é o P(3HB), um polímero produzido por síntese microbiana.

Por outro lado, a produção de biodiesel vem aumentando significativamente nos últimos anos e órgãos de fomento à pesquisa lançaram editais direcionados ao uso de coprodutos do biodiesel a fim de minimizar os custos do biodiesel por meio da venda dos coprodutos gerados. O glicerol, seu principal coproduto, é uma fonte de carbono atrativa para o desenvolvimento de diversos micro-organismos.

Neste capítulo, estão apresentados estudos realizados por outros pesquisadores e grupos de pesquisa a fim de fundamentar o tema da tese.

2.1 Polihidroxialcanoatos - PHAs

Os PHAs são poliésteres alifáticos formados por carbono, oxigênio e hidrogênio, cuja fórmula estrutural está representada na Figura 1 (GOMES e BUENO NETTO, 1997; OJUMO *et al.*, 2003). A composição da cadeia lateral (R) e o valor de n determinam a identidade da unidade monomérica. Cerca de 150 diferentes unidades monoméricas já foram identificadas como constituintes dos PHAs em várias bactérias (LEE, 1996a).

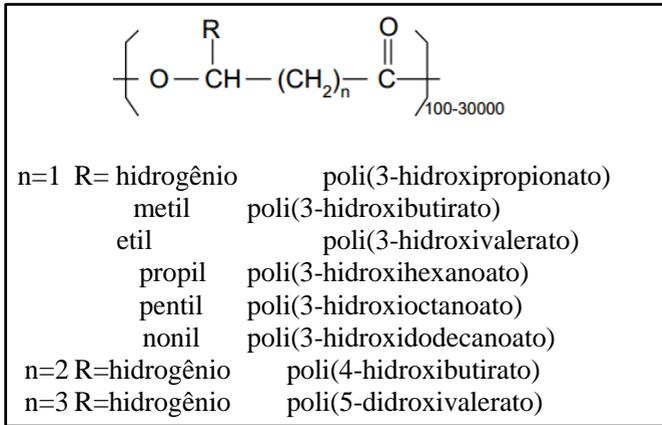


Figura 1. Fórmula química estrutural dos polihidroxialcanoatos (PHAs) produzidos por bactérias (GOMES e BUENO NETTO, 1997; OJUMO *et al.* 2003).

Diversas bactérias podem ser usadas para produção de PHAs, sendo divididas em dois grupos baseados nas condições de cultivo: aquelas que necessitam da limitação de algum nutriente essencial, como nitrogênio, fósforo, magnésio, potássio, oxigênio ou enxofre e outras que não requerem a limitação de nutrientes e acumulam o polímero durante a fase de crescimento. As linhagens que utilizam glicerol como fonte de carbono para produzir PHB são às que necessitam de restrição de algum nutriente para o acúmulo do polímero. Pertencem a esse grupo: *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas extorquen* e *Pseudomonas oleovorans* (POSADA *et al.*, 2010).

A forma mais comum de produção de PHAs é a fermentação submersa conduzida em batelada, batelada alimentada ou de forma contínua. Contudo, Castilho *et al.* (2009) propôs o uso de fermentação em estado semi-sólido para a produção de P(3HB).

2.1.1 Poli(3-hidroxibutirato)- P(3HB)

O poli(3-hidroxibutirato) ou P(3HB), é um poliéster natural e biodegradável da família dos PHAs, sintetizado e acumulado no interior de diversos micro-organismos (ANDERSON e DAWES, 1990), como ilustra a Figura 2.

O P(3HB) é um homopolímero altamente cristalino, rígido e quebradiço, o que reduz sua aplicação, porém, a adição de agentes nucleantes, plastificantes ou outros aditivos tem sido utilizados para conferir novas aplicações ao P(3HB) (NONATO *et al.*, 2001). De acordo com Gumel *et al.* (2012) o tipo da fonte de carbono utilizado como substrato não somente afeta o polímero produzido em termos das propriedades físico-químicas e mecânicas, como também seu rendimento e composição monomérica. Em seu trabalho com *Delftia tsuruhatensis* Bet002, os autores avaliaram diversos ácidos graxos como fontes de carbono com 8 a 18 carbonos observando que com os ácidos mirístico, palmítico e esteárico obtiveram somente P(3HB) com propriedades térmicas levemente diferentes. Já com o ácido oleico obtiveram um polímero composto de 87,7 % de P(3HB), 2,03 % de P(3HV) (poli(3-hidroxi valerato)), 0,96 % de P(3HH) (poli(3-hidroxi hexanoato)), 8,35 % de P(3HO) (poli(3-hidroxi octanoato)) e 0,96 % de P(3HD) (poli(3-hidroxi decanoato)).

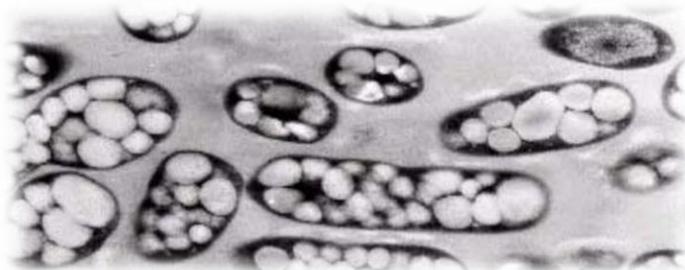


Figura 2. Grânulos do polímero biodegradável P(3HB) no interior das bactérias (BRAUNEGG *et al.*, 1998).

Por ser produto um de síntese microbiana, o P(3HB) é um polímero biodegradável, que lançado no ambiente sofre ação de outros micro-organismos e se degrada em CO_2 e H_2O (JUSTI, 1991).

Muitos estudos sobre as propriedades térmicas e físicas dos polímeros bacterianos têm sido realizados, principalmente com o P(3HB) e seu copolímero P(3HB-co-3HV). O P(3HB) apresenta todos os seus átomos de carbono ligados assimetricamente, possuindo cristalinidade variando entre 55 a 80 % e como consequência é quebradiço ao menor toque (LEE, 1996b).

Os monômeros (HB) são polimerizados em polímeros com alta massa molecular ponderal média (M_w) sendo que a do P(3HB) varia entre 1×10^4 a 3×10^6 Da, dependendo do micro-organismo e das

condições de crescimento, apresentando índice de polidispersividade (M_w/M_n) de aproximadamente 2,0 (SUDESH *et al.*, 2000). O P(3HB), como todos os PHAs, é insolúvel em água, ou seja, hidrofóbico, podendo ser degradado por uma variedade de micro-organismos (JENDROSSEK *et al.*, 1996). Apresenta características similares ao polipropileno (PP) (MARANGONI *et al.*, 2000). Ambos os polímeros fundem a temperaturas muito próximas: 180 °C para o P(3HB) e 174 °C para o PP. A temperatura de transição vítrea (T_g) é a temperatura na qual os polímeros passam do estado vítreo para o estado borrachoso, adquirindo um certo grau de flexibilidade devido à maior movimentação entre as cadeias macromoleculares. Esta temperatura é característica para cada polímero. Os valores das T_g 's dos dois polímeros indicam que o PP, por possuir $T_g = -17$ °C, mostra-se mais flexível que o P(3HB) ($T_g = 5$ °C). A maior flexibilidade do PP em relação ao P(3HB) é confirmada através do módulo de elasticidade (ou módulo de Young) do PP (1700 MPa), que é bem inferior ao do P(3HB) (3500 MPa). O módulo de elasticidade de um polímero está diretamente relacionado com a sua rigidez ou flexibilidade de forma que, quanto mais alto o módulo, maior a rigidez do polímero. No entanto, ambos os polímeros apresentam alto grau de cristalinidade. De acordo com a caracterização de Cavalheiro *et al.* (2009) uma baixa massa molecular é obtida quando P(3HB) é sintetizado por *C. necator* quando glicerol é usado como substrato (M_w na ordem de 10^5 Da) enquanto que, segundo os autores, algo em torno de 10^6 Da é obtido quando glicose, frutose ou sacarose são usados como fonte de carbono no cultivo.

As aplicações do P(3HB) são diversas, estando presentes nas embalagens biodegradáveis, em embalagens de produtos agrícolas no transporte de pequenas mudas (VOLLGELSANGER *et al.*, 2002), na engenharia tecidual, em função de sua biocompatibilidade, para fabricação de próteses e outros componentes médicos devido ao fato de não gerar em sua degradação substâncias tóxicas (BYROM, 1987; WILLIAMS *et al.*, 1999), em escovas de dente (MEDEIROS *et al.*, 2005), na formulação de cápsulas para liberação controlada de fármacos e pesticidas (SUAVE *et al.*, 2010).

2.2 *Cupriavidus necator*

São conhecidos mais de 300 micro-organismos capazes de sintetizar P(3HB), mas somente poucas bactérias são efetivamente empregadas na sua produção. Estas incluem *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, vários isolados de

metilotrofos, *Pseudomonas oleovorans* e, recentemente, as recombinantes *Cupriavidus necator*, *Escherichia coli* e *Klebsiella aerogenes*. Estas bactérias foram selecionadas principalmente porque podem ser eficientemente cultivadas com alta densidade celular acumulando alta concentração de P(3HB) em um período relativamente curto de tempo, resultando em alta produtividade (definida como grama de P(3HB) produzido por litro de meio fermentado por hora). A alta produtividade é um fator muito importante para que se consiga diminuir os custos de produção dos polímeros biodegradáveis (LEE, 1996a). Contudo, as bactérias que apresentam as características mais favoráveis para a produção industrial são *Azotobacter sp.*, *Methylobacterium sp.* e *Cupriavidus necator* (BYROM, 1992), essencialmente em razão da variedade de substratos que elas podem utilizar.

Cupriavidus necator, inicialmente classificada como *Alcaligenes eutrophus* e como *Ralstonia eutropha*, é uma bactéria procariótica, Gram-negativo, quimiolitotrófica facultativa, com incidência natural no solo e na água. Apresenta-se na forma de bastonete com diâmetro de 0,5 µm e comprimento de 1,8 a 2,6 µm e possui de 1 a 4 flagelos peritríquios, portanto sendo móvel. Na fase de acúmulo do polímero as células geralmente se tornam esféricas (MARANGONI, 2000).

O acúmulo de PHAs por *C. necator* ocorre em condições onde há falta de algum nutriente essencial para o crescimento celular, conciliado com o excesso de carbono (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997). Os PHAs sintetizados por *Cupriavidus necator*, em seus respectivos meios e condições de cultivo, compreendem o 3-hidroxivalerato (3HV), 3-hidroxibutirato (3HB), 4-hidroxibutirato (4HB) e 5-hidroxivalerato (5HV) (REE *et al.*, 1992). A incorporação de diferentes unidades monoméricas depende essencialmente das condições e do meio de cultura (VIGNESWARI *et al.*, 2009). Alguns polímeros e copolímeros comercialmente produzidos são: P(3HB), poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxi-valerato (P(3HB-co-3HV)), poli-3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato (P(3HB-co-4HB)), poli-3-hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato (P(3HB-co-HHx)) e alguns PHAs de cadeia média (CHEN, 2009).

Cavalheiro *et al.* (2012) sintetizou copolímeros de P(3HB) utilizando como fonte de carbono glicerol bruto de biodiesel para o crescimento de *C. necator* e produção do 3HB e para a incorporação do monômero 4HB acrescentou γ -butirolactona ao meio.

Cupriavidus necator pode acumular até 80 % de sua massa celular na forma de P(3HB), com alta massa molar e sob diferentes tipos de substratos (BYROM, 1987). Bormann e Roth (1999) cultivaram

Cupriavidus necator na presença de glicerol e caseína hidrolizada, obtendo um rendimento médio de 47 % de P(3HB) em 67 h de cultivo. Já Mothes *et al.* (2007), avaliaram o uso de glicerina bruta (10 g L^{-1}) adicionada de sais para produção de P(3HB) e os resultados se mostraram promissores. Cavalheiro *et al.* (2009), também avaliaram o uso de glicerina bruta e comercial purificada (com pureza de 86-88 %) na produção de P(3HB) por *C. necator* e chegaram ao acúmulo de 50 e 63 % do polímero, respectivamente, para glicerina bruta e purificada.

2.3 Síntese de biodiesel

O biodiesel é uma alternativa aos combustíveis derivados do petróleo, podendo ser utilizado em carros e qualquer outro veículo com motor a diesel. O biodiesel é fabricado a partir de fontes renováveis (girassol, soja, mamona), sendo um combustível que emite menos poluentes que o diesel. A molécula de óleo vegetal é um triglicerídeo, formado por três moléculas de ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerina. O Brasil apresenta grandes vantagens para produção de bicombustíveis, pois possui geografia favorável, situa-se em uma região tropical, com altas taxas de luminosidade e temperaturas médias anuais. Associada a disponibilidade hídrica e regularidade de chuvas, torna-se o país com maior potencial para produção de energia renovável (BODIESELBR, 2011, web). Vários países vêm adotando a adição de um percentual de biodiesel ao diesel derivado do petróleo. No Brasil, desde janeiro de 2008, tornou-se obrigatório a adição de 2 % de biodiesel em diesel e em 2013 esse percentual deve chegar a 5 %. Percentual esse que foi atingido muito antes da meta, e desde 2011 os produtores demandam para que a mistura passe a ter um percentual de 7 % e que em 2012 chegue até 10 % de biodiesel (OLIVEIRA, 2011). Segundo Silva *et al.* (2009) o Brasil se tornará o maior produtor e consumidor de biodiesel por duas razões: a primeira devido à tradição do uso do álcool como combustível automotor e a segunda devido às condições extremamente favoráveis, territoriais e climáticas, para a produção de plantas oleaginosas.

O biodiesel é obtido pela transesterificação (reação orgânica na qual um éster é transformado em outro por meio da troca dos grupos alcóxidos) dos triglicerídeos de óleos e gorduras de origem vegetal ou animal com um monoálcool de cadeia curta, tipicamente metanol ou etanol, na presença de um catalisador, produzindo uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos e glicerol, como ilustrado na Figura 3.

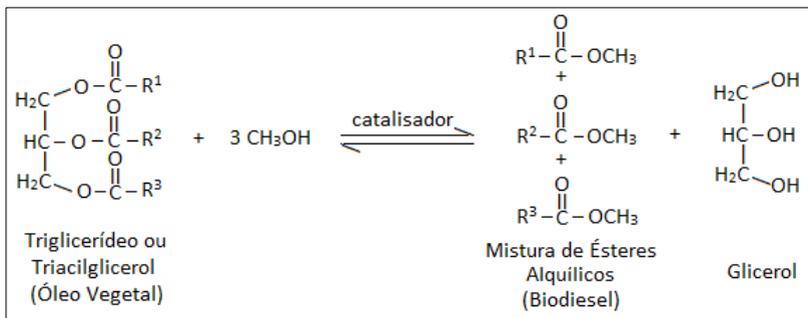


Figura 3. Esquema da transesterificação de um triglicerídeo genérico com metanol. (Fonte: RINALDI *et al.*, 2007).

A princípio, a transesterificação é uma reação reversível. Entretanto, o glicerol formado é praticamente imiscível no biodiesel, reduzindo fortemente a extensão da reação reversa. A imiscibilidade do glicerol no biodiesel é um fator que favorece o rendimento da reação, entretanto, a possibilidade de formação de emulsões estáveis, em certos casos, pode exigir um longo período de repouso para separação das fases de biodiesel e glicerol (KNOTHE *et al.*, 2005 *apud* RINALDI *et al.*, 2007). Em geral, a transesterificação pode ser catalisada tanto por ácidos como por bases, sendo que, a reação catalisada por bases (utilizando hidróxido ou alcóxido de sódio ou potássio) apresenta a vantagem de poder ser realizada à temperatura ambiente e, mesmo assim, ser mais rápida que a transesterificação catalisada por ácidos, a qual necessita ser realizada em temperaturas elevadas (cerca de 170 °C) (FERRARI *et al.*, 2005).

A produção de biodiesel em todo o mundo cresceu exponencialmente ao longo dos últimos anos. O principal subproduto desta produção é o glicerol, também conhecido como glicerina. Ela ocorre em óleos vegetais em um nível de cerca de 10 % em massa. Para cada litro de biodiesel produzido, cerca de 80 g são de glicerol bruto. O glicerol bruto possui um valor muito baixo no mercado por causa das impurezas. Como a demanda e produção de biodiesel vem crescendo, a quantidade de glicerol bruto gerado é considerável e a utilização deste coproduto é um tema urgente. A composição do glicerol bruto varia de acordo com a matéria prima e com o processo de produção do biodiesel utilizado. Antes de utilizar o glicerol bruto deve-se caracterizá-lo quanto

aos seus aspectos físicos, químicos e nutricionais (THOMPSON e HE, 2006).

2.4 Glicerol

Glicerol é o nome comum do 1,2,3-propanotriol, descoberto por Carl W. Scheele em 1779 durante a separação de uma mistura aquecida de óxido de chumbo preparada com óleo de oliva. Os seus sinônimos são glicerina, trihidroxipropano, glicil álcool e 1,2,3-trihidroxipropano (RIVALDI *et al.*, 2008).

Na natureza, o glicerol existe em vegetais (soja, mamona, babaçu, girassol, palma, algodão, coco, dendê, pinhão manso) e animais em formas combinadas de glicerina com ácidos graxos. É um composto com grande importância dentro do sistema metabólico de micro-organismos, atuando como precursor de numerosos compostos e como regulador de vários mecanismos bioquímicos intracelulares (LAGES *et al.*, 1999).

Em micro-organismos eucarióticos, o glicerol constitui o principal composto formado para regular as variações de atividade de água em ambientes altamente osmofílicos (WANG *et al.*, 2001).

Em humanos, participa na termoregulação do corpo, na resistência a altas temperaturas, na resistência dos músculos em atividades físicas e na resposta neural da variação da glicemia (YANG *et al.*, 1999). Na sua forma pura apresenta-se como um líquido viscoso, inodoro, incolor, higroscópico, com sabor doce, solúvel em água e álcool, insolúvel em éter e em clorofórmio.

O excesso de glicerol proveniente da produção de biodiesel associado à baixa demanda mundial (0,5 bilhões t/ano) e baixo custo, projetam um desequilíbrio econômico nas indústrias oleoquímicas e de refino de glicerol, que podem colocar em risco a sustentabilidade econômica de usinas de biodiesel no mundo (HGCA, 2006). No Brasil, a maioria das plantas industriais de biodiesel não valoriza efetivamente o glicerol. A projeção do volume de glicerol no país para o ano de 2013 é de 488 milhões de toneladas e as perspectivas, nesse sentido, não são auspiciosas, devido a poucas indústrias apresentarem planos futuros para sua conversão em produtos de maior valor agregado. Atualmente o preço *Free on Board* (FOB) do glicerol bruto varia de 200 a 400 R\$/t, sendo que o valor do glicerol parcialmente tratado (para remoção de impurezas) varia de 600 a 800 R\$/t. Estima-se que na próxima década, mantendo-se a tendência favorável para o biodiesel, o preço do glicerol coproduzido poderá diminuir ainda mais (RIVALDI *et al.*, 2008).

Com o aumento crescente de produção do biodiesel, o custo da glicerina originada do processo de produção vem sofrendo forte pressão de queda em função da elevação da oferta, especialmente nos mercados europeu e americano, o que, muitas vezes, torna o seu processo de refino economicamente inviável, particularmente quando essas unidades são de pequena escala e estão localizadas distantes dos centros de refino e do mercado consumidor.

Em um artigo de revisão, Silva *et al.* (2009) já apontavam o glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel como sendo uma promessa de fonte de carbono abundante para a microbiologia industrial. Os autores destacaram a bioconversão do glicerol em produtos de alto valor agregado através de fermentação microbiana, tais como a produção do 1,3-propanodiol, ácido succínico, ácido propiônico, etanol, ácido cítrico, pigmentos, polihidroxialcanoatos e biosurfactantes.

A característica mais surpreendente do glicerol, segundo Arruda *et al.* (2006), é o número e a variedade de processos não só industriais, mas também metabólicos no qual ele está envolvido. Uma vez que ele é intermediário de vários processos metabólicos em numerosos organismos, sua importância é fundamental, sugerindo uma origem comum e antiga do mesmo. Além disso, essa conservação evidencia que a síntese de glicerol e seu metabolismo exercem uma importante função fisiológica, como fonte de carbono e energia, como agente crioprotetor e osmoregulador para os micro-organismos. Já em seres humanos vem sendo utilizado como parâmetro em diagnósticos de doenças e aplicações terapêuticas. Também se observa um grande número de processos industriais no qual o glicerol vem sendo utilizado como na indústria alimentícia, farmacêutica, química e têxtil. Os autores sumarizam as aplicações do glicerol no diagrama da Figura 4.

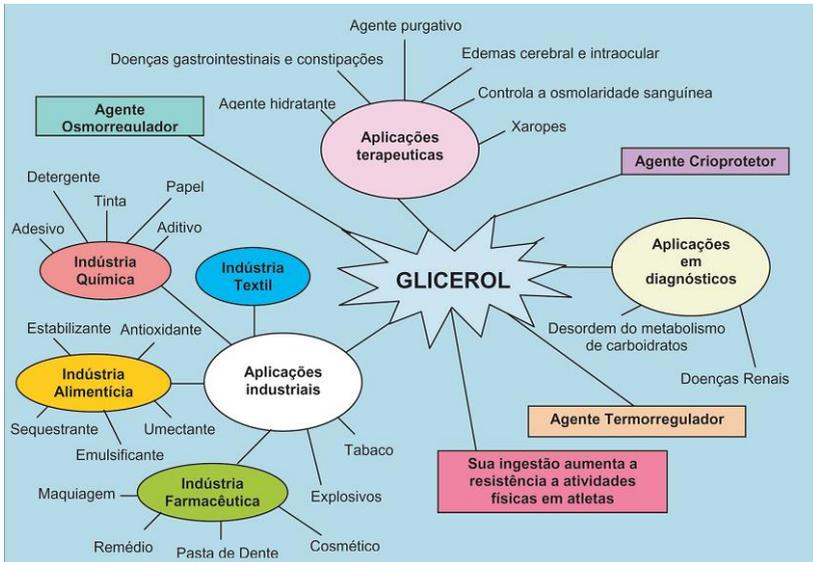


Figura 4. Aplicações do glicerol (Fonte: ARRUDA *et al.*, 2006).

De acordo com Ayub (2011), a aplicação biotecnológica do glicerol bruto é relativamente nova, apresentando ao mesmo tempo um desafio científico e uma oportunidade de desenvolvimento tecnológico. No Brasil, o avanço tecnológico no aproveitamento do glicerol e na busca de soluções biotecnológicas pode ser evidenciado pelo grande número de trabalhos apresentados no XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos - SINAFERM, 2011. Por exemplo, Rossi *et al.* (2011) estudaram a produção de etanol utilizando glicerol residual como fonte de carbono; Amon *et al.* (2004), Santos *et al.* (2006) e Amorin *et al.* (2011) investigaram a purificação da glicerina bruta oriunda do biodiesel e seu uso na produção de biogás e geração de energia (digestão anaeróbica em biodigestores, quando associada a resíduos orgânicos com alto teor de nitrogênio); Silva *et al.* (2011a) avaliaram o efeito da interação da milhocina, glicerina e uréia na produção de quitosana; Santos *et al.* (2011a) avaliaram o uso de glicerol como substrato para biomassa de levedura; Meinicke *et al.* (2011) determinaram os parâmetros cinéticos da influência da fonte de nitrogênio na produção de pigmentos vermelhos por *Monascus ruber*, utilizando glicerol como substrato; Ferreira *et al.* (2011) avaliaram a capacidade produtora de 1,3-propanodiol a partir de glicerina bruta por *Citrobacter freundii* e

Lactobacillus brevis; Santos *et al.* (2011b), Branco *et al.* (2011) e Nascimento *et al.* (2011) estudaram a produção de carotenóides a partir do cultivo de leveduras utilizando glicerol proveniente da produção de biodiesel como fonte de carbono; Piccoli *et al.* (2011) investigaram, a partir de glicerol residual de biodiesel, a produção de PHB por sete diferentes linhagens de bactérias isoladas no IPT em cultivo com alta densidade celular. Dessas sete bactérias, foram selecionadas quatro linhagens produtoras de PHB a partir de resíduo de biodiesel com velocidade específica de crescimento, segundo os autores, condizente com a literatura; Silva *et al.* (2011b) utilizaram glicerol residual de biodiesel e soro de leite como substratos alternativos para a produção de ácido gama-poliglutâmico; Tabuchi *et al.* (2011) avaliaram a fonte de nitrogênio na produção de bioinseticida *Bacillus thuringiensis israelensis* a partir de glicerol; Sousa *et al.* (2011) estudaram o uso do glicerol em processo de produção de celulases por *Trichoderma* INPA 1218; Rivaldi *et al.* (2011) determinaram a cinética de crescimento de espécies de *Lactobacillus* em meio contendo glicerol; Silva *et al.* (2011c) investigaram a produção de etanol por *Klebsiela pneumoniae* utilizando glicerol como substrato; Santos *et al.* (2011c) avaliaram a produção de PHAs a partir de glicerol. E segundo Mothes *et al.* (2007), o glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel pode ser um substrato para a produção via biotecnológica de PHA, utilizando *Cupriavidus necator* ou *Paracoccus denitrificans* tendo o polímero isolado características similares às dos polímeros produzidos com glicose.

2.5 Estado da arte

Na Tabela 1 está apresentada uma síntese dos principais resultados obtidos por diversos autores que utilizaram glicerol como substrato para a produção de P(3HB).

Tabela 1. Resultados obtidos por alguns autores utilizando glicerol como fonte de carbono, diferentes fontes de nitrogênio, diferentes micro-organismos e diferentes escalas de produção de P(3HB).

Micro-organismo	Fonte de carbono e nitrogênio	Condição	Produção máxima de P(3HB) (g L^{-1})	Acúmulo de P(3HB) (%)	Fator de conversão ($\text{g}_{\text{P(3HB)}} \text{g}_{\text{C}}^{-1}$)	Avaliação das propriedades do P(3HB)	Referência
Consórcio microbiano	Glicerol bruto de biodiesel (10 %) / cloreto de amônio	Biorreator batelada alimentada	-	45 a 62	-	$M_w = 200$ a 380 kDa ; $T_m = 158$ a $175 \text{ }^\circ\text{C}$; $T_g = -5$ a $5 \text{ }^\circ\text{C}$ Resistência à tração = 14 MPa ; módulo de Young = $1,8 \text{ GPa}$	Dobrouth <i>et al.</i> , 2011
1IPT 066			2,70	38,9	-		
IPT 105	Glicerol bruto 10 g L^{-1} / $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Batelada alimentada em biorreator de 5 L (alta densidade celular – $> 20 \text{ g L}^{-1}$)	4,57	35,4	-		Piccoli <i>et al.</i> , 2011
IPT 100			3,63	45,5	-	Não avaliou	
IPT 072			2,92	34,6	-		
<i>Bacillus</i> sp.	Glicerol puro 20 g L^{-1} / $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Erlenmeyer de 500 mL com 200 mL de meio	0,6	30	-	RMN e comparou com P(3HB) Sigma-Aldrich	Santos <i>et al.</i> , (2011c)
<i>Zobellella denitrificans</i> MW1	Meio mineral com sais e glicerol (15 g L^{-1})	Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio	$4,27 \pm 0,1$	$84,8 \pm 0,6$	$0,29 \pm 0,3$	Não avaliou	Ibrahim e Steinbüchel, (2010)

Micro-organismo	Fonte de carbono e nitrogênio	Condição	Produção máxima de P(3HB) (g L ⁻¹)	Acúmulo de P(3HB) (%)	Fator de conversão (g _{P(3HB)} g _C ⁻¹)	Avaliação das propriedades do P(3HB)	Referência
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Glicerol comercial / (NH ₄) ₂ SO ₄	Batelada alimentada em biorreator de 2 L, contendo 1,5 L de meio alta densidade celular	51,2	62	-	M _n =304 kDa; M _w =957 kDa; M _w /M _n =3,15	Cavalheiro <i>et al.</i> (2009)
	Glicerol bruto / (NH ₄) ₂ SO ₄		38,1	50	-	M _n =215 kDa; M _w =786 kDa; M _w /M _n =3,66	
<i>Escherichia coli arca</i> mutante CT1061	Meio Sabouraud substituindo glicose por glicerol *Melhor condição: 22,02 g L ⁻¹ glicerol, 1,78 g L ⁻¹ caseína e 1,83 g L ⁻¹ inóculo	Planejamento experimental* Erlenmeyer de 250 mL microaerado 4L batelada microaerado Validando o planejamento 3 L de volume inicial batelada alimentada microaerado	3,38 3,52 10,81	41±8 42 51	0,21		Nickel <i>et al.</i> , (2008)
<i>Cupriavidus necator</i> JMP 134	10 g L ⁻¹ de glicerol bruto / (NH ₄) ₂ SO ₄ e NH ₄ OH	Batelada alimentada em biorreator de 2 L (alta densidade celular – 24 g L ⁻¹)	-	58 a 60	0,14	Não avaliou	
<i>Cupriavidus necator</i> JMP 134 e <i>Paracoccus denitrificans</i>	10 g L ⁻¹ de glicerol / (NH ₄) ₂ SO ₄ e NH ₄ OH 10 g L ⁻¹ de glicerol grau analítico / (NH ₄) ₂ SO ₄ e NH ₄ OH	Frascos agitados	65 para ambos micro-organismos 70 para ambos micro-organismos	-	-	<i>P. denitrificans</i> M _w =750 kDa; M _w /M _n =2,6; T _m =169 °C; T _c =90 °C; T _g =10 °C <i>C.necator</i> M _w =620 kDa; M _w /M _n =3,7; T _m =173 °C; T _c =97 °C; T _g =10 °C	Mothes <i>et al.</i> (2007)

Micro-organismo	Fonte de carbono e nitrogênio	Condição	Produção máxima de P(3HB) (g L ⁻¹)	Acúmulo de P(3HB) (%)	Fator de conversão (g _{P(3HB)} g _C ⁻¹)	Avaliação das propriedades do P(3HB)	Referência
<i>Escherichia coli</i> JM109 recombinant e, contendo fragmento do gene 4826 bp <i>Sau3A</i> I do DNA genômico de <i>Streptomyces aureifaciens</i> NRRL 220	2 % de glicerol/ 0,5 % de extrato de levedura e 0,5 % de peptona	Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do meio	-	60 %	-	MEV: O tamanho dos grãos de PHB observados na <i>E.coli</i> recombinante são comparáveis aos produtos naturais	Mahishi, <i>et al.</i> (2003)

Dobrouth *et al.* (2011) utilizando um consórcio microbiano, produziu P(3HB) utilizando glicerol bruto proveniente de duas manufaturas de biodiesel nos EUA como fonte de carbono e solução de cloreto de amônia 150 g L^{-1} como fonte de nitrogênio para o cultivo, operando em biorreatores de escala laboratorial em bateladas alimentadas. Os maiores rendimentos em PHB foram obtidos nos reatores em que foram utilizados os maiores tempos de residência dos sólidos e quando existia uma maior concentração de metanol no meio e as condições eram mais aeróbias. Os melhores resultados para o acúmulo de PHB utilizando glicerol bruto ficaram entre 45 e 62 %. Um decréscimo acentuado nesses valores foi observado quando glicerol puro foi utilizado, resultando em um acúmulo de PHB entre 5 a 8 %.

Quatro linhagens produtoras de P(3HB) foram selecionadas por Piccoli *et al.* (2011) e ensaios em biorreator de 5 L com altas densidades celulares ($>20 \text{ g L}^{-1}$) foram conduzidos utilizando glicerol bruto (proveniente de uma planta piloto de produção de biodiesel a partir de óleo de soja e metanol, via catálise básica) numa concentração inicial de 10 g L^{-1} e tendo como fonte de nitrogênio inicial $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Na fase onde não havia limitação do nitrogênio, o pH foi controlado pela adição de NH_4OH e na fase de produção do polímero, essa solução foi trocada por uma solução de NaOH , para não fornecer nitrogênio ao micro-organismo. Os ensaios foram conduzidos a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ em pH 7,0 e oxigênio dissolvido acima de 20 %. Durante a fase de crescimento foram efetuados 3 pulsos de 200 mL de solução de glicerol ($416,7 \text{ g L}^{-1}$) juntamente com os sais. Após essa fase, novos pulsos foram efetuados, porém trocando-se a solução de controle de pH, por uma solução de NaOH , para favorecer o acúmulo de PHB. A concentração de glicerol nesses pulsos foi de 83,3 %. Os teores de P(3HB) variaram entre 35 e 45 %, valores inferiores aos obtidos pelos autores durante a fase de seleção das linhagens feita em cultivo com baixa concentração celular. Os autores atribuem essa diminuição ao possível efeito inibitório causado pelo acúmulo de sais provenientes do resíduo de biodiesel utilizado como fonte de carbono.

Santos *et al.* (2011c) cultivaram *Bacillus* sp. em erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio mineral, utilizando como fonte de carbono glicerol grau analítico numa concentração de 20 g L^{-1} , a uma temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e agitação de 170 min^{-1} . Nessas condições atingiram no cultivo uma concentração celular de 2 g L^{-1} as quais acumularam 30 % de sua massa em P(3HB). O *Bacillus* sp. produz P(3HB) de forma associada ao crescimento, não sendo necessário o processo de fermentação em duas etapas. Testando ainda diferentes

concentrações de glicerol no meio (10 a 100 g L⁻¹) os autores observaram que em altas concentrações de glicerol o crescimento de *Bacillus* sp. é inibido.

Ibrahim e Steinbüchel (2010) isolaram bactérias produtoras de P(3HB) de ambientes alemães e egípcios utilizando no meio mineral uma concentração de 20 g L⁻¹ de glicerol como fonte de carbono. A bactéria isolada e identificada como produtora de P(3HB) foi a linhagem *Zobellella denitrificans* MW1 (isolada de amostras de sedimentos de água residuária do Egito). Para produção de P(3HB) foram utilizados frascos Erlenmeyer de 1000 mL contendo 300 mL de MSM (meio mineral com sais) com 20 g L⁻¹ de glicerol como fonte de carbono. Os frascos foram incubados a 37 °C e 200 min⁻¹. A concentração máxima de células foi obtida em 100 h de cultivo (3,7 g L⁻¹), contendo 73,5 % de P(3HB) acumulado, restando no meio 10 g L⁻¹ de glicerol. Em seguida, os autores avaliaram a influência da temperatura na produção do polímero (variando de 30 a 45 °C), desta vez utilizando frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de MSM e glicerol a 20 g L⁻¹. O percentual máximo de acúmulo de P(3HB) foi de 81,2 %, obtido a 41 °C, chegando a uma concentração celular de 3,6 g L⁻¹. Além disso, os autores avaliaram o efeito de diversas fontes de carbono no acúmulo de P(3HB), chegando ao melhor resultado (84,8 % de acúmulo de P(3HB), com concentração celular de 5,04 g L⁻¹) utilizando MSM contendo 20 g L⁻¹ de NaCl e glicerol numa concentração de 15 g L⁻¹ como fonte de carbono (restando no meio após o cultivo 2,8 g L⁻¹), incubado a 41 °C e 200 min⁻¹.

Em cultivo de batelada alimentada com alta concentração celular Cavalheiro *et al.* (2009) cultivaram *Cupriavidus necator* DSM 545 para a produção de P(3HB) utilizando glicerol bruto e também glicerol comercial (com 86 a 88 % de pureza) como única fonte de carbono do cultivo, em fermentador de 2 L contendo 1,5 L de meio a 34 °C e pH controlado em 6,8. A concentração celular chegou a 82,5 g L⁻¹, acumulando 62 % de polímero utilizando glicerol comercial. Utilizando glicerol bruto, a concentração celular foi de 68,8 g L⁻¹, acumulando 38 % de P(3HB). Os autores, assim como Mothes *et al.* (2007), também constataram uma inibição na produção de P(3HB) devido ao acúmulo de Na⁺ no meio proveniente do processo de transesterificação dos óleos vegetais para a produção do biodiesel. Os autores reduziram a concentração celular para cerca 50 g L⁻¹ e, nesse caso, o fator inibitório foi reduzido obtendo-se um acúmulo de 50 % de P(3HB).

Nickel *et al.* (2008) sintetizaram P(3HB) a partir de *E. coli* recombinante utilizando glicerol como substrato. Para definir as

variáveis que afetavam o cultivo, esses autores realizaram um planejamento experimental do tipo Placket & Burmann e, através dele, determinou-se que as variáveis significativas para a produção de P(3HB) eram a concentração de glicerol, a concentração de caseína e a concentração de inóculo. Seguindo com o trabalho, fez-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) utilizando essas variáveis e obteve-se como resposta de melhores condições para o processo: $22,02 \text{ g L}^{-1}$ de glicerol, $1,78 \text{ g L}^{-1}$ de caseína e $1,83 \text{ g L}^{-1}$ de inóculo. Em experimento em frasco Erlenmeyer, nestas mesmas condições, e com cultivo microaerado obteve-se produção máxima de célula de $8,26 \pm 0,97 \text{ g L}^{-1}$ acumulando $41 \pm 8 \%$ de P(3HB) no seu interior. Na ampliação da escala para batelada em reator de 5,6 L, contendo 4 L de meio, foram obtidos $8,37 \text{ g L}^{-1}$ de células secas e $3,52 \text{ g L}^{-1}$ de P(3HB) perfazendo um acúmulo de 42 %. No ensaio em batelada alimentada, os autores iniciaram com 3 L de meio no reator e atingiram concentrações de $21,17 \text{ g L}^{-1}$ e $10,81 \text{ g L}^{-1}$ respectivamente para biomassa e P(3HB), sendo o acúmulo neste caso de 51 %.

Para avaliar o efeito dos contaminantes do glicerol bruto proveniente de manufaturas de biodiesel, Mothes *et al.* (2007) cultivaram *Paracoccus denitrificans* e *Cupriavidus necator* JMP 134, em frascos agitados avaliando primeiramente o acúmulo de P(3HB) utilizando glicerol puro e duas amostras tipicamente encontradas nas manufaturas, uma contaminada com NaCl e outra com K_2SO_4 . Durante a fermentação a baixa concentração celular (3 g L^{-1}), resultados muito similares foram obtidos com as duas linhagens tanto para o glicerol de grau analítico quanto para as amostras de glicerol bruto, chegando a um acúmulo de 70 e 65 % de P(3HB), respectivamente. Para verificar o efeito do acúmulo dos contaminantes no crescimento e na síntese de P(3HB), os autores cultivaram *C. necator* JMP 134 com altas densidades celulares. A concentração celular no final da fase de crescimento foi incrementada em passos para 7 g L^{-1} , 14 g L^{-1} e 25 g L^{-1} aumentando a concentração dos componentes do meio em 18 vezes e a concentração de fosfato em 2 vezes. A limitação em amônia foi iniciada mudando-se de NH_4OH para KOH a solução de correção de pH. Ao atingir a concentração de 14 g L^{-1} de células, o efeito do acúmulo de sais contaminantes na síntese de P(3HB) foi observada. E esse efeito foi mais pronunciado com o incremento da concentração de células para 25 g L^{-1} . Usando glicerol bruto contaminados com K_2SO_4 , a síntese de P(3HB) parou entre 58 a 60 % de massa seca. Esse efeito inibitório foi mais pronunciado quando glicerol contaminado por NaCl foi utilizado. O acúmulo de P(3HB) cessou em 48 %, quando a concentração de NaCl

atingiu 10 g L^{-1} . Contudo o uso de glicerol contendo até 5 a 6 % de NaCl não foi inibitório.

Mahishi *et al.* (2003) avaliaram o efeito de diversas fontes de carbono e nitrogênio sobre o crescimento de *Escherichia coli* JM109 recombinante, contendo fragmento do gene 4826 bp *Sau3A I* do DNA genômico de *Streptomyces aureifaciens* NRRL 2209 para o acúmulo de P(3HB). As fontes de carbono testadas foram glicerol, glicose, óleo de palma, etanol, sacarose e melaço, todas na concentração de 1 %, e as de nitrogênio foram: extrato de levedura e peptona (ambas a 0,5 %), extrato de levedura (1 %), peptona (1 %), ou água de maceração de milho (1 %). Os experimentos foram realizados em Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio, agitados a 200 min^{-1} e incubados a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 h. Os melhores resultados foram obtidos quando glicerol foi utilizado como fonte de carbono, alcançando um crescimento celular de $8,01 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$, em 30 h de cultivo. Mesmo após cessado o crescimento, a bactéria seguiu acumulando P(3HB) até 50 h de cultivo, chegando a cerca de 60 % de P(3HB). Utilizando extrato de levedura ou peptona como fonte de nitrogênio e glicerol como fonte de carbono, o acúmulo de P(3HB) nas células de *E. coli* recombinante foi de 30 % da sua massa seca, porém quando essas fontes foram adicionadas conjuntamente um efeito cumulativo foi observado e o acúmulo de P(3HB) passou para cerca de 60 % da massa seca.

2.6 Biodegradação de polímeros

Os impactos ambientais negativos causados pelo descarte de polímeros convencionais direcionaram os estudos para o desenvolvimento de polímeros biodegradáveis. A principal vantagem em usar o P(3HB) como um material termoplástico é a sua biodegradabilidade. Isso ocorre, pois muitos micro-organismos secretam enzimas que podem rapidamente despolimerizar a cadeia de P(3HB). A biodegradação ou degradação biológica compreende as alterações de sistemas poliméricos pelo ataque destrutivo de micro-organismos, tais como fungos e bactérias (REICH e STIVA, 1971). Na natureza, os polímeros são degradados preferencialmente por reações hidrolíticas. A presença de éster, éter ou ligações amida facilita a degradação biológica. Pelo menos duas categorias de enzimas estão ativamente envolvidas na degradação biológica do polímero: as depolimerases extracelulares e intracelulares. PHB depolimerases extracelulares são secretadas a partir de vários micro-organismos e desempenham um papel importante no metabolismo de P(3HB) no ambiente. Diversas PHB depolimerases têm sido isoladas e purificadas a partir de vários micro-organismos das

espécies *Alcaligenes*, *Comamonas* e *Pseudomonas*. Isto mostra que PHB depolimerases extracelulares são onipresentes no ambiente (SHAH *et al.* 2008).

Os PHAs podem ser degradados tanto intracelularmente, por meio de depolimerases intracelulares, como extracelularmente. No entanto, a taxa de degradação intracelular de P(3HB) é cerca de 10 vezes menor do que sua taxa de síntese (SUDESH *et al.*, 2000). Depolimerases extracelulares são secretadas por muitas bactérias para utilização de PHA liberado no ambiente depois da lise das bactérias produtoras. Depolimerases extracelulares não são capazes de hidrolisar grânulos intracelulares e depolimerases intracelulares não são capazes de hidrolisar P(3HB) extracelular. Isso aparentemente acontece em decorrência das diferenças nas estruturas físicas dos grânulos intracelulares e extracelulares. Estes últimos são polímeros altamente cristalinos, enquanto os grânulos intracelulares são estruturas amorfas, cuja superfície é recoberta por uma camada composta de proteínas e fosfolipídios. Essa camada protetora é perdida ou danificada quando do isolamento dos grânulos por tratamentos com solventes químicos ou qualquer outro estresse físico (JENDROSSEK *et al.*, 1996).

Kunioka *et al.* (1989) estudaram a biodegradação de copoliésteres em solo e lodo ativado e observaram que a temperatura e a entalpia de fusão dos copolímeros diminuíram com o aumento da fração de 4HB, indicando que unidades de 4HB atuam como agentes que danificam a estrutura reticulada do cristal de P(3HB). Embora não tenha havido diferença no grau de cristalinidade dos copolímeros, a taxa de degradação do P(3HB-*co*-9 % 4HB) foi maior do que a do P(3HB) e do P(3HB-*co*-50 % 3HV), ou seja, o fator determinante para biodegradação foi a composição do polímero. Doi *et al.* (1990) relataram resultados semelhantes para copolímeros contendo unidades monoméricas de 4HB. Os autores observaram que em lodo aerado ativado, a 30 °C, os filmes de 3HB-*co*-9 % 4HB foram completamente decompostos em 14 dias, enquanto o P(3HB) levou mais de 10 semanas para se decompor. Diferentes depolimerases parecem ser secretadas por um complexo de populações microbianas que ocorrem no solo, resultando em diferentes taxas de degradação.

Mergaert *et al.* (1993) argumentam que diferenças nas taxas de degradação dos polímeros são devidas às diferenças na cristalinidade, considerando que os copolímeros possuem maiores regiões amorfas. Essa conclusão foi ratificada pelos experimentos de Doi *et al.* (1990), que mostraram que a perda de massa foi inversamente proporcional ao grau de cristalinidade. Por outro lado, Doi *et al.* (1990) demonstraram

que a taxa de degradação hidrolítica, diferentemente da degradação enzimática, não é dependente da cristalinidade do polímero e sim da sua composição química. Conclui-se, portanto, que a taxa de degradação dos polímeros varia dependendo do ambiente em que se encontra a amostra (umidade, disponibilidade de nutrientes, pH), aumentando em função da temperatura (Mergaert *et al.*, 1993), do grau de cristalinidade, da massa molar do polímero e da incorporação de unidades monoméricas na cadeia polimérica (SUDESH *et al.*, 2000).

A decomposição de P(3HB) é da ordem de poucos meses, quando submetidos à digestão anaeróbia (SCHNEIDER *et al.*, 2010).

O grupo de Materiais Poliméricos da Univille vem estudando a adição de óleos vegetais com base no conteúdo em ácido oléico para incrementar a síntese do polímero. Resultados promissores foram obtidos quando ácido oléico e ácido linoléico foram utilizados como suplemento nutricional para produção de copolímero poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) por *Cupriavidus necator* (denominada anteriormente *Ralstonia eutropha*) e quando ácido oléico foi adicionado no início da fase de crescimento e no início da fase de produção de P(3HB) pelo mesmo organismo. O aumento da concentração de ácido oléico levou a uma diminuição da entalpia de fusão e conseqüentemente do grau de cristalinidade. A T_m praticamente não variou para as concentrações entre 0 e $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de ácido oleico. No entanto, com $3,0 \text{ g L}^{-1}$ a T_m diminuiu $11 \text{ }^\circ\text{C}$ em relação à amostra controle (sem ácido oléico), bem como apresentou um início de fusão dos cristalitos à temperatura de $148,8 \text{ }^\circ\text{C}$. Não houve diferença na degradação com relação à variação de ácido oleico (GRIGULL *et al.*, 2008). Outro resultado obtido pelo grupo foi o aumento de produtividade de P(3HB) utilizando biodiesel como suplemento nutricional (MAZUR *et al.*, 2009).

2.7 Processo de biodegradação de materiais poliméricos

O processo da biodegradação de materiais poliméricos demonstrado na Figura 5 inclui vários estágios e o processo de degradação pode terminar em qualquer um desses estágios (LUCAS *et al.*, 2008):

- O primeiro estágio compreende a biodeterioração, no qual a ação combinada de comunidades microbianas, organismos decompositores e outros fatores abióticos fragmentam os materiais biodegradáveis em pequenas frações.

- O segundo estágio é a despolimerização, no qual os microorganismos secretam agentes catalíticos, como por exemplo, as enzimas e os radicais livres, que são capazes de clivar moléculas poliméricas reduzindo progressivamente a sua massa molecular. Este processo gera oligômeros, dímeros e monômeros.
- Algumas moléculas são reconhecidas por receptores de células microbianas e podem atravessar a membrana plasmática. As outras moléculas permanecem no ambiente extracelular e podem ser objeto de diferentes modificações.
- O terceiro estágio é a assimilação. No citoplasma, as moléculas transportadas passam a integrar o metabolismo microbiano para produzir energia, nova biomassa, vesículas de armazenamento e numerosos metabólitos primários e secundários.
- O quarto estágio é a mineralização. Ao mesmo tempo, alguns metabólitos simples e complexos podem ser excretados e atingir o ambiente extracelular (por exemplo, ácidos orgânicos, aldeídos, terpenos, antibióticos, etc.) moléculas simples como CO_2 , N_2 , CH_4 , H_2O e diferentes sais dos metabólitos intracelulares, que são completamente oxidados e liberados no ambiente.

O termo biodegradação indica a predominância da atividade biológica neste processo. Contudo, na natureza, fatores bióticos e abióticos agem sinergicamente para decompor a matéria orgânica. Vários estudos sobre a biodegradação de alguns polímeros mostram que a degradação abiótica precede a assimilação microbiana. Consequentemente, a degradação abiótica não deve ser negligenciada.

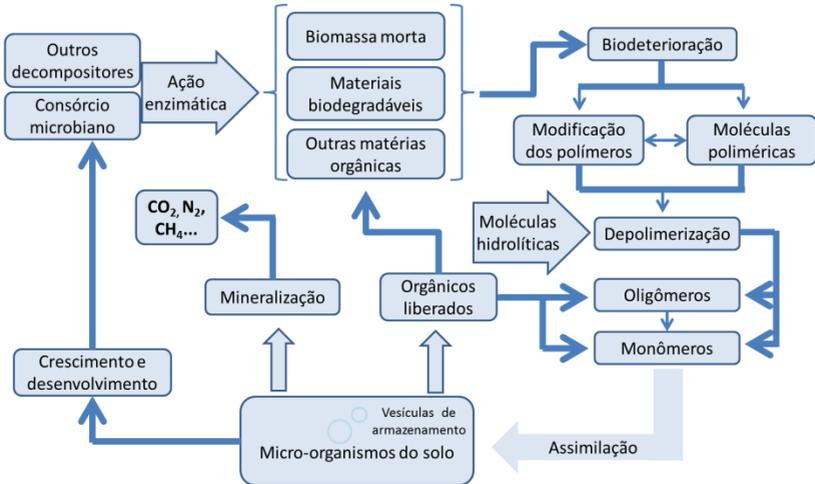


Figura 5. Esquema do processo de biodegradação de materiais poliméricos (Adaptado de LUCAS *et al.*, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo estão descritas todas as condições experimentais bem como as técnicas analíticas utilizadas no desenvolvimento deste trabalho. A metodologia utilizada nos cálculos, bem como as análises estatísticas também estão apresentadas para o entendimento dos valores calculados.

3.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi a bactéria *Cupriavidus necator* – DSM 545, mutante da linhagem DSM 529 H1 para consumo de glicose (anteriormente denominada *Ralstonia eutropha*), conforme definição proposta pela *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (Coleção de Micro-organismos e Cultura de Células da Alemanha) (www.dsmz.de). Para sua manutenção, foi empregado o cultivo em tubos de ensaio contendo meio sólido inclinado (ágar nutriente), com repiques mensais. Essa cultura foi incubada a 30 °C durante 48 h e a seguir armazenada em refrigerador a 4 °C. A composição do meio ágar nutriente utilizado foi de 5,0 g L⁻¹ de peptona de carne, 3,0 g L⁻¹ de extrato de carne e 15 g L⁻¹ de ágar.

3.1.1 Meios de cultivo

A ativação das células foi realizada em caldo nutriente (NB) constituído de 5,0 g L⁻¹ de peptona de carne e 3,0 g L⁻¹ de extrato de carne, sendo este considerado pré-inóculo para as culturas e utilizado em uma fração de 10 % em relação ao volume de trabalho utilizado.

O meio de cultivo utilizado para as culturas foi formulado segundo Aragão (1996) e denominado meio mineral (MM). A sua composição está demonstrada nas Tabelas 2 e 3. Nos estudos realizados com glicerol, a fonte de carbono foi substituída total ou parcialmente por diferentes concentrações de glicerol, conforme o experimento delineado.

Tabela 2. Composição do meio mineral (MM).

	A	B	C	
Componente	Concentração da solução estoque (g L ⁻¹)	Volume (mL) ^a utilizado no meio de cultivo	Concentração inicial no meio de cultivo (g L ⁻¹)	
SOLUÇÃO 1	ácido nitriloacético (NTA)	19,1	10	0,19
	citrato férrico de amônia	10	6	0,06
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	50	10	0,5
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	5	2	0,01
	(NH ₄) ₂ SO ₄	200	25	5,0
	solução de oligoelementos ^b		1	
	água destilada ^c			
SOLUÇÃO 2 [†]	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	223,8	40	8,95
	KH ₂ PO ₄	37,5	40	1,5
SOLUÇÃO 3	fonte de carbono ^d			30

^a Volume retirado da solução-estoque para preparar 1 L do meio de cultura.

^b A composição da solução de oligoelementos é demonstrada na Tabela 3

^c O volume de água é calculado em função dos volumes das soluções da coluna B e será a quantidade suficiente para 1L.

^d A solução aquosa com a fonte de carbono (açúcar invertido) foi adicionada diretamente ao meio, após ser esterilizada separadamente.

Tabela 3. Composição da solução de oligoelementos.

Elemento	Concentração (g L ⁻¹)	Elemento	Concentração (g L ⁻¹)
H ₃ BO ₃	0,3	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,03
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,2	NiCl ₂ · 6H ₂ O	0,02
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,1	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,01
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,03		

Fonte: Aragão (1996)

Cada uma das substâncias da Tabela 2 foi pesada separadamente, preparando-se frascos contendo soluções-estoque (coluna A). Em seguida, cada constituinte das soluções 1 e 2 foi autoclavado separadamente, a 121 °C por 20 min, sendo depois acondicionado em refrigerador a 4 °C. Para a preparação do meio de cultivo, utilizaram-se

os volumes de solução estoque descritos na coluna B, formaram-se então três soluções que novamente foram autoclavadas durante 20 min a 121 °C. O pH da solução 1 foi ajustado a 7,0 com uma solução de NaOH 7,5 M ou HCl 11 M. Após resfriamento, as três soluções foram misturadas assepticamente para inoculação do micro-organismo.

3.2 Fontes do glicerol

Quatro diferentes fontes de glicerol empregado como substrato foram utilizados neste trabalho.

(1) Resíduo da produção de biodiesel em laboratório próprio empregando a rota metílica proposta por Albuquerque (2006). Misturou-se 20 g de álcool metílico com 1 g de KOH em agitação constante até homogeneização completa formando o metóxido de potássio. Acrescentou-se 100 g de óleo de soja usado sob constante agitação por 50 minutos em temperatura ambiente para ocorrer a transesterificação. Em seguida, transferiu-se a mistura para um funil de decantação até a separação das fases. A fase mais densa foi o glicerol bruto (GB) utilizado nos experimentos preliminares e no último ensaio realizado em biorreator.

(2) e (3) Duas fontes de glicerol bruto utilizadas nos ensaios em biorreator obtidas a partir de duas rotas de síntese distintas e gentilmente cedidas pelo grupo de Materiais de Tecnologias Limpas da PUCRS. Rota metílica, semelhante a anteriormente descrita e outra de rota etílica, a qual foi utilizada a relação de 1:6 (óleo de soja:etanol) e como catalisador 1 % de KOH. Logo ao final da reação de esterificação, em ambos os casos, a mistura foi levada para o rotavapor para retirada do excesso de álcool e separação do biodiesel bruto e do glicerol bruto.

(4) Nos ensaios em que foi utilizado glicerol de alta pureza, utilizou-se glicerol PA da Fluka.

3.3 Condições de cultivo

3.3.1 Culturas iniciais

As células foram ativadas em frascos de Erlenmeyer aletados de 500 mL contendo 100 mL de meio NB, sendo incubadas em *shaker* a 30 °C com movimento rotatório de 150 min⁻¹ durante 12 h (pré-inóculo). Após esse período, a cultura foi transferida para o meio MM, em uma fração de inóculo de 10 % (V/V). O cultivo para preparo do inóculo foi conduzido em frascos de Erlenmeyer aletados de 1.000 mL, contendo

300 mL de meio MM sem limitação de nitrogênio e incubados por 24 h, 150 min⁻¹ e 30 °C.

3.3.2 Ensaios realizados em frascos agitados

3.3.2.1 Ensaios de verificação da viabilidade de uso do glicerol como substrato ou cosubstrato para *C. necator*

Para avaliar o glicerol (bruto e purificado) como substrato ou cosubstrato no crescimento de *Cupriavidus necator* e sobre a produção de P(3HB) foram realizados experimentos em frascos Erlenmeyer aletados de 1.000 mL, contendo 300 mL de meio MM, sendo o pH mantido em 7,0 pela adição de NaOH 30 % ou HCl 40 %, em duplicata. A agitação e temperatura foram mantidas constantes a 150 min⁻¹ e 30 °C. Como controle foi utilizado meio contendo açúcar invertido na concentração de 30 g L⁻¹. Esse mesmo meio foi utilizado nos ensaios em que o glicerol foi utilizado como cosubstrato (3 g L⁻¹ de glicerol bruto ou purificado). Com o objetivo de avaliar o uso do glicerol como única fonte de carbono, os ensaios foram realizados com o mesmo meio supra citado porém sem o açúcar invertido.

3.3.2.2 Ensaios de otimização das condições de cultivo de *C. necator* para produção de P(3HB)

As células de *Cupriavidus necator* foram cultivadas em frascos de Erlenmeyer aletados de 1.000 mL, contendo 300 mL de meio MM, tendo como fonte de carbono açúcar invertido (glicose e frutose) e/ou glicerol PA Fluka, em concentrações conforme delineamento composto central rotacional (DCCR) 2³ com 3 pontos centrais, totalizando 17 ensaios, conforme apresentado na Tabela 4. As culturas foram mantidas sob agitação de 150 min⁻¹, nas temperaturas variando entre 28 e 38 °C (conforme experimento), durante 24 h.

O pH do meio de cultivo foi corrigido durante o cultivo para 7,0, quando necessário, mediante a adição de ácido ou base, em assepsia.

Tabela 4 Condições experimentais, com variáveis codificadas e reais: temperatura de cultivo, concentrações de glicerol e açúcar invertido utilizadas no DCCR.

Ensaio	Variáveis codificadas			Variáveis reais		
	Glicerol (g L ⁻¹)	Açúcar invertido (g L ⁻¹)	Temp. (°C)	Glicerol (g L ⁻¹)	Açúcar invertido (g L ⁻¹)	Temp. (°C)
1	-1	-1	-1	6,1	6,1	30
2	+1	-1	-1	23,9	6,1	30
3	-1	+1	-1	6,1	23,9	30
4	+1	+1	-1	23,9	23,9	30
5	-1	-1	+1	6,1	6,1	36
6	+1	-1	+1	23,9	6,1	36
7	-1	+1	+1	6,1	23,9	36
8	+1	+1	+1	23,9	23,9	36
9	0	0	-1,68	15	15	28
10	0	0	+1,68	15	15	38
11	0	-1,68	0	15	0	33
12	0	+1,68	0	15	30	33
13	-1,68	0	0	0	15	33
14	+1,68	0	0	30	15	33
15	0	0	0	15	15	33
16	0	0	0	15	15	33
17	0	0	0	15	15	33

3.3.2.3 Validação do delineamento composto central rotacional (DCCR)

Para validar o delineamento composto central rotacional foram realizados ensaios, em Erlenmeyer aletado de 1.000 mL, contendo 300 mL de meio, em triplicata, na condição apontada pelo modelo predito pelo DCCR como a maior produtora de P(3HB).

3.3.3 Ensaio realizados em biorreator

Para facilitar o entendimento dos ensaios, por serem com as mesmas concentrações de substrato, foram adotadas as seguintes abreviações: AI/SG para o cultivo realizado em meio contendo 30 g L^{-1} de açúcar invertido sem adição de glicerol, AI/GP para o cultivo realizado em meio com 30 g L^{-1} de açúcar invertido e 15 g L^{-1} de glicerol puro, AI/GB para meio contendo glicerol bruto obtido de reação de esterificação para obtenção de biodiesel por rota metílica produzido na UNIVILLE, AI/GBm para meio contendo glicerol bruto produzido na PUCRS por rota metílica e AI/GBe para meio contendo glicerol bruto obtido por rota etílica também na PUCRS.

Os ensaios foram conduzidos em biorreator (Figura 6) sendo o meio de cultura definido conforme a melhor condição validada em experimento em *shaker*.

O biorreator utilizado (B-Braun) com cuba 2 L (volume útil igual a 1,5 L) foi autoclavado por 20 min a $121 \text{ }^\circ\text{C}$, contendo a solução 1 (Tabela 2). Após o processo de esterilização, foram adicionadas as soluções 2 (fontes de nitrogênio) e 3 (fontes de carbono), previamente esterilizadas, de forma a atender as concentrações previstas no experimento de validação do DCCR, exceto para a substância sulfato de amônio, cuja concentração foi de $2,3 \text{ g L}^{-1}$ para condições com limitação em nitrogênio.

O inóculo foi adicionado na quantidade equivalente a 10 % (V/V) do volume final de meio no biorreator. Os parâmetros para condução do processo foram: pH 7,0 (controlado com NaOH 7,5 M, ou HCl 11 M); agitação e aeração de 400 a 780 min^{-1} e $0,12$ a 1 vvm , respectivamente, de forma que a pressão parcial de oxigênio dissolvido ($p\text{O}_2$) não ficasse abaixo de 20 %. Como antiespumante, foi utilizado polipropilenoglicol 2000 da Fluka.

A limitação do nitrogênio ocorre naturalmente nas culturas em decorrência do crescimento celular. A determinação da fase de crescimento foi feita com base na dosagem do nitrogênio (item 3.4.5). Considerou-se o final da fase de crescimento e, portanto, início da fase de produção do polímero, o momento em que ocorria a exaustão de nitrogênio.



Figura 6. Dispositivo experimental de cultivo em biorreator.

3.4 Técnicas analíticas para acompanhamento do cultivo

3.4.1 Processamento das amostras

3.4.1.1 Ensaio em frascos agitados

Foram retiradas alíquotas de 5 mL a cada 4 h para determinação da concentração de biomassa (gravimetria), do pH (corrigido para 7,0, se necessário), da síntese de P(3HB) e do consumo de substrato, conforme Figura 7.

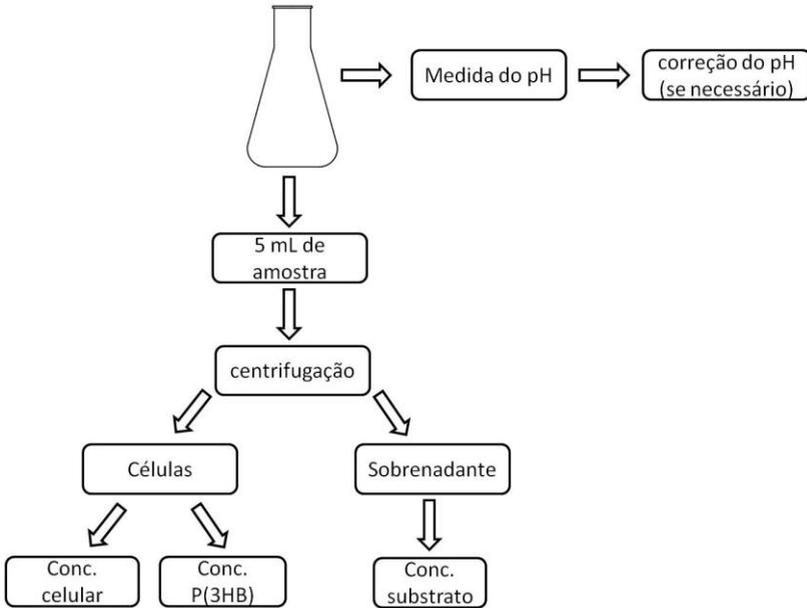


Figura 7. Fluxograma do processamento das amostras para os ensaios conduzidos em frascos de Erlenmeyer.

3.4.1.2 Ensaios em biorreator

Alíquotas de 20 mL foram retiradas em intervalos de 3 h para determinação das concentrações de biomassa (turbidimetria e gravimetria), P(3HB), nitrogênio, proteína total e consumo de substrato (Figura 8).

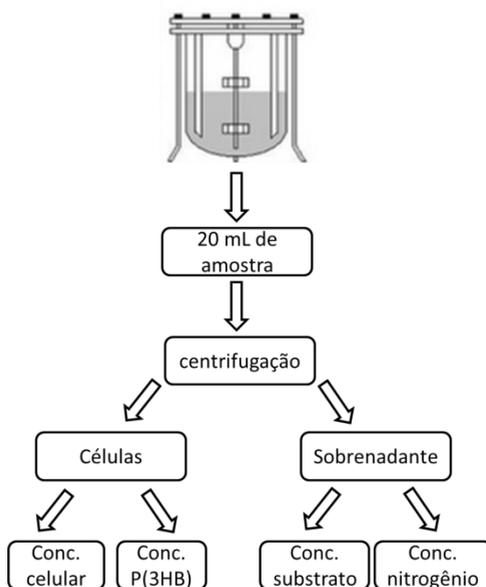


Figura 8. Fluxograma do processamento das amostras para os ensaios conduzidos em biorreator.

3.4.2 Biomassa

A biomassa foi medida por turbidimetria e por gravimetria. Leituras de absorbância das suspensões de células provenientes dos cultivos em biorreator foram realizadas em um espectrofotômetro (LKB Biochron – Novaspec II), a 600 nm, para um acompanhamento das fases de crescimento.

Tubos de microcentrifugação de 2 mL (Eppendorf) foram previamente secos em estufa da marca WTC BINDER a 60 °C por 24 h e pesados em balança analítica da marca Mettler AT250. Dois mL da amostra foram colocados nesse tubo e centrifugados a 9000 min^{-1} por 10 min. Em seguida, o meio foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com água destilada. A água foi descartada após nova centrifugação e as células foram secas em estufa a 60 °C até massa constante. Essa massa foi então convertida em concentração celular expressa em g L^{-1} .

3.4.3 Determinação da concentração de P(3HB) (metanólise)

Um volume de 2 mL de meio foi centrifugado e as células lavadas duas vezes com água destilada, sendo depois congeladas e posteriormente submetidas à metanólise, conforme o método baseado em Braunegg *et al.* (1988), com as modificações propostas por Brandl *et al.* (1988). Em seguida, o P(3HB) foi dosado por cromatografia gasosa (CG).

Para elaboração da curva padrão, o polímero puro (Aldrich) foi pesado de forma a se obter massas entre 0,001 e 0,05 g. Os padrões foram submetidos à etapa de metanólise, bem como as amostras.

3.4.3.1 Metanólise

Foram acrescentados 2 mL de metanol acidificado e 2 mL de clorofórmio sobre as células; os tubos foram muito bem fechados (utilizou-se fita veda-rosca) e as células foram resuspensas em agitador vórtex. Em seguida, os tubos foram aquecidos a 100 °C por 1 h em banho termostático com tampa.

Decorrido esse tempo, os tubos foram retirados um a um e agitados em vórtex, retornando para o banho por mais 1 h e 20 min, sendo após este tempo resfriados em banho de gelo.

Após o abaixamento da temperatura até temperatura ambiente, acrescentou-se 1 mL de água destilada agitando-se novamente no vórtex por 30 s para após a decantação haver a formação de duas fases. Com uma pipeta Pasteur, retirou-se a fase inferior (clorofórmio mais polímero) passando-a aos frascos de amostra para a análise por CG.

3.4.3.2 Cromatografia gasosa

A coluna utilizada para a dosagem de P(3HB) foi a de sílica fundida (0,53 mm/30 m) modelo Supercowax 10. O cromatógrafo foi o CG-System 6890 marca Agilent equipado com um detector de ionização de chama (FID – hidrogênio e oxigênio). O gás de arraste utilizado foi hélio com fluxo constante de 3,5 mL min⁻¹, as temperaturas de injeção e detecção foram de 250 °C com temperatura da coluna aumentando em rampa, de 80 a 200 °C (20 °C min⁻¹).

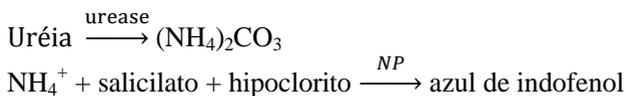
3.4.4 Determinação da concentração de substrato

As concentrações de açúcar invertido e glicerol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Merck Hitachi modelo D-7000IF) com detector de índice de refração modelo RI-71 Merck, com a coluna de marca Transgenomic, modelo IC Sep ICE-ION Column (troca de prótons). A fase móvel utilizada foi H_2SO_4 8,5 mmol L^{-1} tendo fluxo de eluente de 0,4 mL min^{-1} e temperatura do forno de 70 °C com volume de injeção de 10 μL .

3.4.5 Determinação do teor de nitrogênio

Para verificação do consumo de nitrogênio foi utilizado o kit Uréia ES, baseado no método enzimático-colorimétrico Berthlot, utilizado para determinar a uréia no soro, no plasma e na urina.

Nesse método, a uréia é transformada em carbonato de amônio na presença de urease. O íon amônio, na presença de salicilato, hipoclorito e nitroprussiato (NP), forma azul de indofenol, conforme esquema a seguir, produto cuja intensidade da cor formada é diretamente proporcional à concentração de uréia na amostra.



Reativos do kit

- Reativo 1: 100 mL de solução-tampão fosfato 0,1 M, salicilato 0,3 M, nitroprussiato de sódio 17 mM e EDTA 7 mM
- Reativo 2: 17 mL de hipoclorito de sódio 0,32 M em NaOH 4,0 M
- Reativo 3: 20 mL de solução de urease em tampão fosfato
- Reativo 4: solução padrão: 5 mL de solução aquosa de uréia 60 mg dL^{-1}
- Reativo 1 A: mistura de 5 partes do reativo 1 com 0,2 parte de reativo 3

O preparo das amostras (devidamente diluídas), assim como das soluções padrão e branco, foi realizado de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5. Volumes de água, amostra e reagentes a serem utilizados na dosagem de nitrogênio.

	Branco	Padrão	Amostra
Padrão	---	10 µL	---
Amostra	---	---	10 µL
Reativo 1A	1 mL	1 mL	1 mL
Misturar. Incubar exatamente 5 min a 37 °C. Adicionar:			
Reativo nº 2	1 mL	1 mL	1 mL
Misturar. Incubar exatamente 5 min a 37 °C.			

A leitura da absorbância foi realizada a 600 nm em espectrofotômetro LKB Biochron – Novaspec II, zerando-se o aparelho com o branco. A reação é estável por até 2 h e a concentração de nitrogênio foi calculada de acordo com a Equação 1:

$$NH_4^+ (mg dL^{-1}) = \frac{Abs amostra}{Abs padrão} \times 60 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

NH_4^+ é a concentração de nitrogênio na forma de amônia determinada na reação;

Abs amostra é a absorbância obtida da leitura da amostra em espectrofotômetro a 600 nm;

Abs padrão é a absorbância obtida da leitura do padrão em espectrofotômetro a 600 nm.

3.5 Metodologia utilizada para determinação dos parâmetros cinéticos

Considerando-se que o acúmulo de P(3HB) é intracelular, é importante a definição dos termos a seguir, para melhor entendimento da metodologia adotada para os cálculos:

X_t (biomassa total) = biomassa celular contendo P(3HB) intracelular

X_r (biomassa residual) = X_t – P(3HB) intracelular

3.5.1 Fatores de conversão

O fator de conversão de substrato em célula $Y_{Xr/S}$ ($g g^{-1}$) foi determinado por meio do coeficiente angular da linearização dos pontos

experimentais correspondentes a fase de crescimento de *C. necator* no gráfico de dispersão da concentração celular *versus* a concentração de substrato.

O fator de conversão de substrato em produto $Y_{P(3HB)/S}$ ($g\ g^{-1}$) foi determinado através do coeficiente angular da linearização dos pontos experimentais correspondentes a fase de produção do polímero no gráfico de dispersão da concentração de P(3HB) *versus* a concentração de substrato.

3.5.2 Produtividade global

A produtividade global em células P_{Xr} ($g\ L^{-1}\ h^{-1}$) e a produtividade global em polímero $P_{gP(3HB)}$ ($g\ L^{-1}\ h^{-1}$) foram determinadas por meio do coeficiente angular da linearização dos pontos experimentais correspondentes às curvas de crescimento de *C. necator* e de produção de P(3HB) no gráfico de dispersão das concentrações celular e de polímero, respectivamente, *versus* o tempo de cultivo.

3.5.3 Produtividade da fase de produção de P(3HB)

A produtividade em polímero na fase de produção $P_{P(3HB)}$ ($g\ L^{-1}\ h^{-1}$) foi determinada por meio do coeficiente angular da linearização dos pontos experimentais correspondentes a fase de produção na curva de produção de P(3HB) por *C. necator* no gráfico de dispersão da concentração do polímero *versus* o tempo de cultivo.

3.5.4 Velocidades específicas de crescimento celular, formação de produto e consumo de substrato

A partir dos perfis de concentração celular, formação de produto e consumo de substrato com o tempo, foi possível determinar, em cada instante, as velocidades instantâneas de crescimento microbiano (dX/dt), de formação de produto ($dP(3HB)/dt$) e de consumo de substrato (dS/dt).

Dividindo-se as velocidades instantâneas pela concentração celular residual no ponto, obtém-se as velocidades específicas de crescimento celular (μ_{Xr}), formação de produto (μ_p) e de consumo de substrato (μ_s), conforme Equações 2, 3 e 4, respectivamente.

$$\mu_{Xr} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (\text{Equação 2})$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (\text{Equação 3})$$

$$\mu_s = \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad \text{Equação 4)}$$

A velocidade específica de crescimento da fase de crescimento celular constante, considerada neste trabalho como a velocidade específica máxima de crescimento, foi calculada por meio do coeficiente angular da reta obtida, relacionando-se o logaritmo neperiano da massa celular (X) com o tempo, de acordo com a Equação 5.

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu_{\text{máx}} t \quad \text{(Equação 5)}$$

onde:

X é a concentração celular;

X_0 é a concentração celular inicial;

$\mu_{\text{máx}}$ é a velocidade específica máxima de crescimento;

t é o tempo de cultivo.

3.6 Recuperação do P(3HB) produzido

3.6.1 Extração de P(3HB)

Ao término de cada ensaio, o meio foi congelado em frascos apropriados até a extração de P(3HB) a qual foi realizada seguindo-se o método adaptado por Formolo *et al.* (2005).

Para a extração, após o descongelamento da amostra em banho térmico, o meio foi homogeneizado e então, retiradas alíquotas de 2 mL, que foram transferidas para microtubos de centrifuga e centrifugadas a 8.000 min^{-1} por 15 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com água destilada e centrifugadas conforme anteriormente mencionado. Em seguida, foram adicionados 1 mL de clorofórmio e 1,25 g de pérolas de vidro com 0,75 mm de diâmetro para rompimento das células microbianas. Os microtubos foram fechados, vedados com auxílio de fita crepe e levados ao moinho (Retsch) por 20 min em rotação máxima. Os microtubos foram novamente centrifugados a 8.000 min^{-1} por 15 min. Houve a formação de três fases: a inferior, composta pelas pérolas de vidro; a intermediária, contendo clorofórmio e polímero dissolvido e a superior, formada pelos rejeitos (*debris*) celulares. Com auxílio de uma pipeta automática, retirou-se a fase intermediária, que foi vertida em placas de Petri e foram deixadas para secagem à temperatura ambiente. Formando assim um filme polimérico.

3.6.2 Purificação dos filmes de P(3HB)

Como o filme formado após a extração do polímero ainda contém muitas impurezas, foi necessário um processo de purificação em n-hexano.

O polímero foi dissolvido em clorofórmio na razão de 1:100 (m:V) em recipiente fechado, sendo aquecido (máximo de 80 °C) sob agitação magnética. Após a total dissolução, verteu-se essa solução em n-hexano na proporção de 1:2 (V:V), sem aquecimento, mas sob constante agitação. Imediatamente houve a separação de fase pela adição de não solvente do polímero, recuperados por filtração a vácuo. O produto seco retido na membrana foi pesado novamente e dissolvido em clorofórmio na concentração de 0,1 g L⁻¹, vertido sobre uma placa de Petri e deixado evaporar para formação do filme em uma cuba de vidro onde o solvente foi eliminado em atmosfera saturada de clorofórmio para evitar a separação de fases (Figura 9) que ocorre por ação da umidade.

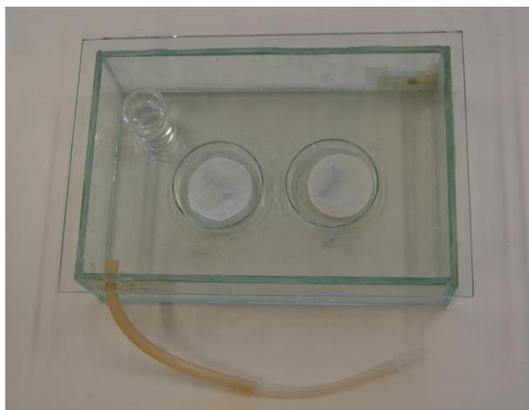


Figura 9. Cubas de vidro para formação do filme por evaporação lenta de solvente.

3.7 Caracterização do P(3HB) sintetizado por *Cupriavidus necator*

O polímero obtido a partir dos cultivos de *Cupriavidus necator* foi caracterizado pelas técnicas de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e difratometria de raios-X (DRX), análise termogravimétrica (TGA), calorimetria

diferencial exploratória (DSC), ensaios mecânicos sob tensão e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3.7.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização dos grupamentos funcionais dos polímeros foi feita por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), em equipamento da Perkin Elmer Spectrum One (Laboratório de Caracterização de Materiais/UFDESC), no intervalo de 4.000 a 450 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e acessório de refletância total atenuada (ATR).

3.7.2. Difratometria de raios-X (DRX)

A cristalinidade dos filmes de P(3HB) sintetizados foi determinada pela técnica de difração de raios-X. Os difratogramas de raios-X das amostras foram obtidos em um difratômetro de raios-X da marca PHILIPS, modelo X'Pert, com fonte de radiação Cu-K ($\lambda = 0,154$ nm). As análises foram realizadas com tensão de 30 kV e corrente de 30 mA. O ângulo 2θ de incidência variou de 3 a 118 ° com velocidade de 2 ° min^{-1} e resolução de 0,02 °. As análises foram realizadas no Laboratório de Caracterização Microestrutural da Universidade Federal de Santa Catarina (LCM/UFSC). O percentual de cristalinidade foi calculado medindo-se a(s) área(s) do(s) pico(s) e a área total do difratograma.

3.7.3 Análise termogravimétrica (TGA)

As análises de TGA dos polímeros sintetizados foram realizadas visando determinar a degradação térmica e a perda de massa (amostras degradadas) e a estabilidade térmica dos polímeros, temperatura de degradação (T_{onset}) e temperatura máxima de degradação ($T_{\text{máx}}$). As curvas de TGA foram obtidas em uma termobalança TGA-Q50/TA Instruments (Laboratório de Materiais/UNIVILLE), sob atmosfera de N_2 . As amostras foram aquecidas de 25 a 600 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} , sob atmosfera de nitrogênio.

3.7.4 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

As análises de DSC foram conduzidas com o objetivo de identificar a temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão

(T_m) e grau de cristalinidade (α_c) dos polímeros sintetizados. As curvas de DSC foram obtidas em um DSC-Q20/TA Instruments (Laboratório de Materiais/UNIVILLE). Para se realizar o teste, as amostras foram colocadas no equipamento juntamente com um material de referência, a cápsula vazia. As amostras foram aquecidas a $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ de 25 a $200\text{ }^\circ\text{C}$, mantendo-as nessa temperatura por 2 min e, em seguida, resfriadas até $-50\text{ }^\circ\text{C}$, sendo novamente aquecidas a $200\text{ }^\circ\text{C}$. As análises foram realizadas sob fluxo de nitrogênio ($50\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$), sendo que o primeiro aquecimento foi realizado para apagar a história térmica do material em teste. O grau de cristalinidade (α_c) foi determinado de acordo com a equação 10, utilizando o valor de ΔH_m^0 padrão considerando o P(3HB) 100% cristalino de 146 J g^{-1} (VOGELSANGER *et al.*, 2002). O grau de cristalinidade por esta técnica foi calculado por meio da Equação 6.

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \times 100\% \quad (\text{Equação 6})$$

Onde: ΔH_m = entalpia de fusão da amostra (J g^{-1})

ΔH_m^0 = entalpia de fusão considerando polímero 100% (J g^{-1})

3.7.5 Propriedades mecânicas sob tração

Estes ensaios foram realizados para avaliar as propriedades mecânicas dos diferentes materiais obtidos. Corpos de prova de 50 mm de comprimento, 10 mm de largura e aproximadamente $0,10\text{ mm}$ de espessura foram pré-condicionados de acordo com a norma ASTM D-618, a $23 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ e 50% de umidade relativa ($\pm 5\%$) por no mínimo 48 h e submetidos a ensaios sob tensão em uma máquina Universal de ensaios EMIC modelo DL 10000/700 com uma célula de carga de 500 N e velocidade de 10 mm min^{-1} (Laboratório Ensaios Mecânicos - UNIVILLE) utilizando a norma ASTM D882-09. Foram registrados os dados de tensão máxima e alongamento na ruptura. O módulo de Young foi calculado usando a curva Tensão versus Deformação, pelo método da tangente apresentado por Canevarolo (2003).

Para a realização do ensaio mecânico sob tensão foram analisados dez corpos de prova de cada amostra. A fim de rejeitar os valores desviantes antes de calcular a média e o desvio padrão das replicatas do ensaio mecânico sob tensão foi utilizado o Teste Q de Dixon com grau de confiança de 90% , seguindo o modelo exposto pelo Departamento de Química da Universidade de Atenas (DIXON'S Q-TEST, 2012, web), mantendo sempre no mínimo seis replicatas para cada amostra.

3.7.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Fragmentos da superfície superior dos filmes foram fixados em um suporte metálico e recobertos com ouro, utilizando-se um metalizador de amostras e os fragmentos foram observados ao MEV marca PHILIPS modelo XL 30 no Laboratório de Caracterização de Materiais (LCM/UFSC).

3.8 Ensaios de biodegradação

O preparo do solo e os ensaios de biodegradação realizados neste trabalho seguiram a metodologia do teste *soil burial* e foram executados com base na norma ASTM G160 – 98.

3.8.1 Preparação do solo

O solo foi preparado com partes iguais de solo fértil (com baixo teor de argila), esterco de cavalo e areia de praia (42 mesh). A massa total da terra seca foi de 15 kg. Após a mistura, a terra foi peneirada com uma peneira de 4 mesh. A terra foi envelhecida por três meses e reexaminada duas vezes por mês, monitorando-se o pH (6,5 a 7,5) e a umidade (20 a 30 %). O pH do solo foi monitorado nesse período e mantido entre 6,5 e 7,5 mediante adição de calcário ou enxofre, respectivamente, para aumentar ou abaixar o pH.

Posteriormente, foi realizado teste para determinação da atividade microbiana do solo. A quantificação de células viáveis foi realizada utilizando técnica de espalhamento, tendo como meio de cultura Plate Count Agar (PCA). Uma alíquota de 10 g de solo foi acondicionada em frasco contendo 100 mL solução salina 0,9 % (diluição 10^{-1}). Foram transferidos 10 mL da solução anterior para o frasco seguinte, contendo 90 mL de solução salina, constituindo a diluição 10^{-2} . Este procedimento se repetiu até a diluição 10^{-5} . Em seguida, foi transferido 0,1 mL de cada diluição, em duplicata, para placas de Petri contendo meio PCA. O espalhamento foi realizado com o auxílio de alça de Drigalski. Posteriormente, as placas foram incubadas a temperatura de 30 °C por 48 h para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC mL⁻¹). Após obtenção de resultado positivo nesse teste, a terra foi acondicionada em copos de Becker de 1 L com cerca de 17 cm de altura, que foram utilizados nos testes de biodegradação.

3.8.2 Ensaio de biodegradação

Os filmes obtidos a partir dos cultivos de *Cupriavidus necator* foram submetidos aos ensaios de biodegradação em solo com base na norma ASTM G160-03. Para tanto, foram utilizados copos de Becker de 17 cm de altura (Figura 10) nos quais foram adicionados o solo preparado e a amostra do polímero cortada no tamanho de 25 cm² a aproximadamente 2 cm do fundo do frasco, sendo colocada uma amostra para cada copo de Becker. As amostras foram acondicionadas em sacos de nylon para não serem perdidas no solo e possibilitar a análise gravimétrica durante a degradação.



Figura 10. Ensaio de biodegradação em solo.

Os copos de Becker foram condicionados em um ambiente onde a temperatura foi controlada em $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e a umidade entre 85 a 95%.

As amostras foram removidas após 7, 14, 21, 28 e 35 dias, cuidadosamente lavadas em água destilada e secas em estufa a vácuo a 40°C por 24 h. Foram avaliadas as mudanças morfológicas (avaliação visual e MEV), gravimetria, propriedades térmicas (TGA e DSC) e variação do grau de cristalinidade (DRX) e cisão de cadeias ou modificação na estrutura química (FTIR).

A análise gravimétrica dos filmes foi realizada em escala analítica após a biodegradação. A degradação microbiana pode ser expressa como porcentagem de redução de massa (Equação 7).

$$\text{Redução de massa (\%)} = \left(\frac{m_0 - m_k}{m_0} \right) \times 100 \% \quad (\text{Equação 7})$$

Onde:

m_0 é a massa inicial da amostra submetida a degradação;

m_k é a massa da amostra no tempo de degradação k .

3.9 Degradação em câmara de envelhecimento acelerado

Amostras dos filmes obtidos nos ensaios AI/GP e AI/SG, com tamanhos de 50 x 1 mm foram expostos em uma câmara de envelhecimento acelerado, mantidas a temperatura média de 45 °C, umidade do ar em 65 %, sob incidência direta dos raios de lâmpadas UV.

O equipamento UV, ilustrado na Figura 11, é adaptado de acordo com a norma ASTM G154-06 e possui oito lâmpadas de mercúrio fluorescentes (Cleo Desempenho 80 W - PHILIPS), UVA = 22 W e UVA / UVB = 0,8 %. A fonte de radiação foi de lâmpadas fluorescentes Philips de 80 W, com irradiação de 310 nm e 400 nm, com uma média de radiação de cerca de 340 nm, com boa equivalência com a radiação solar. Sob as condições utilizadas a dose diária de radiação ultravioleta é de cerca de 0,77 Wh/m².

As amostras foram retiradas aos 7, 14, 28, 49, 63, 77 e 91 dias de exposição e pesadas a fim de verificar a redução de massa durante a degradação pela irradiação UV.

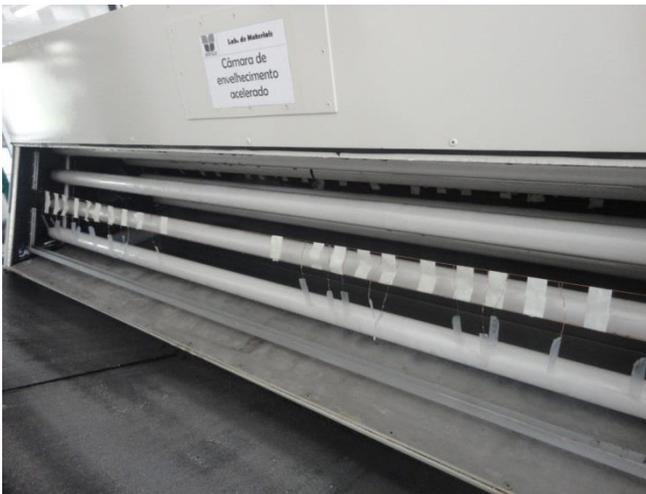


Figura 11. Foto das amostras expostas na câmara de envelhecimento acelerado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo estão apresentados os resultados para a avaliação da influência da temperatura de cultivo de *Cupriavidus necator* e do uso do glicerol como única fonte de carbono ou como cosubstrato na produção de poli(3-hidroxiбутирато).

Para um melhor entendimento dessa sessão optou-se por separar esse capítulo da seguinte maneira: primeiro são apresentados os ensaios preliminares nos quais foi avaliada a possibilidade do uso do glicerol proveniente da produção do biodiesel na biossíntese do P(3HB). Em seguida, são apresentados os ensaios planejados por meio de um delineamento composto central rotacional 2³ no qual foram avaliadas a influência da temperatura e das concentrações de açúcar invertido e glicerol no crescimento de *C. necator*, bem como na produção e acúmulo do polímero pela célula, ensaio este que foi em seguida validado em triplicata avaliando sua cinética. Dando continuidade ao trabalho, seguiu-se com a melhor condição da validação para uma escala em biorreator, também com avaliação cinética e extração dos filmes para a sua caracterização físico-química, térmica e mecânica. E, finalmente, foram realizados os ensaios de degradação por UV e biodegradação em solo com avaliação do material degradado.

4.1 Síntese do biodiesel e extração do glicerol

O glicerol bruto extraído do biodiesel sintetizado no laboratório da UNIVILLE foi analisado em HPLC e em sua composição foi encontrado 40,4 % de impurezas, sendo este um valor relativamente elevado quando comparado ao obtido por Ooi *et al.* (2004) que constatou 30 % de impurezas. Como pode ser observado na Figura 12, a coloração é castanha (fase mais densa), diferentemente do glicerol purificado que é incolor.



Figura 12. Separação das fases na extração do glicerol de biodiesel.

Esse glicerol foi utilizado nos experimentos preliminares como glicerol bruto. O glicerol purificado utilizado foi da Fluka.

4.2 Ensaio em frascos agitados

4.2.1 Ensaio preliminares

Na Tabela 6 estão apresentados os valores de concentração celular (X_t), concentração de polímero (P(3HB)) e o acúmulo percentual de polímero no interior da célula de *C. necator* para os experimentos preliminares, realizados em duplicata.

Tabela 6. Resultados preliminares do cultivo de *C. necator* em glicerol bruto e purificado. Concentração celular (X_t), concentração de P(3HB) e acúmulo percentual de P(3HB).

Ensaio	Condição	X_t (g L ⁻¹)	P(3HB) (g L ⁻¹)	Acúmulo P(3HB) (%)
controle	30 g L ⁻¹ de açúcar invertido	7,3	3,0	40,7
glicerol bruto como substrato	3 g L ⁻¹ de glicerol bruto	2,3	0,4	16,2
glicerol purificado como substrato	3 g L ⁻¹ de glicerol purificado	1,7	0,4	21,9
glicerol bruto como cosubstrato	30 g L ⁻¹ de açúcar invertido e 3 g L ⁻¹ de glicerol bruto	8,0	3,4	42,6
glicerol purificado como cosubstrato	30 g L ⁻¹ de açúcar invertido e 3 g L ⁻¹ de glicerol purificado	8,3	4,3	51,4

A concentração celular foi igual a 2,3 g L⁻¹ e 1,7 g L⁻¹ quando glicerol bruto e purificado foram utilizados, respectivamente, como única fonte de carbono. Quando o glicerol bruto e purificado foram utilizados como cosubstratos, a concentração celular chegou a 8,0 e 8,3 g L⁻¹, respectivamente. Isto já era de se esperar, pois o fornecimento total de energia foi maior na condição em que o subproduto do biodiesel foi adicionado de açúcar invertido. Porém, o objetivo foi verificar se o glicerol não seria um inibidor do cultivo, principalmente na forma bruta por conter diversos resíduos de outros compostos utilizados na produção de biodiesel. Mesmo tendo utilizado uma concentração baixa de glicerol como substrato no meio de cultivo (3 g L⁻¹), verificou-se que o crescimento celular não foi inibido e que as células foram capazes de acumular P(3HB) no interior das células. Mothes *et al.* (2007) levantou a questão da inibição do crescimento de *C. necator* devido ao acúmulo de sais no meio provenientes da transesterificação dos óleos para produção do biodiesel. Porém, quando o glicerol foi utilizado como cosubstrato no cultivo, pode-se verificar que as células foram capazes de acumular em média 42,6 e 51,4 % de P(3HB) quando foi adicionado ao meio glicerol bruto e purificado, respectivamente. Quando comparou-se esses dados com o experimento controle (utilizando açúcar invertido como fonte de carbono) onde foram obtidas concentrações celulares média de 7,2 g L⁻¹ e acúmulo de 40,7 % de P(3HB), pode-se considerar que o uso do glicerol bruto é viável pois proporciona resultados semelhantes ao controle. O uso do glicerol purificado como cosubstrato

do cultivo proporciona aumento percentual de produção de P(3HB) na ordem de 20 % em relação ao glicerol bruto.

4.2.2 Ensaios delineados

Para avaliação da influência da temperatura no cultivo de *Cupriavidus necator* DSM 545, e a influência das concentrações de açúcar invertido e glicerol purificado um delineamento composto central rotacional foi utilizado.

Na Tabela 7 estão apresentados os 17 ensaios realizados com as condições experimentais utilizadas e as respostas obtidas nos experimentos.

Tabela 7. Condições experimentais dos ensaios delineados e as respostas em X_t (g L^{-1}), X_r (g L^{-1}) e P(3HB) (g L^{-1}).

Ensaio	Glicerol (g L^{-1})	Açúcar invertido (g L^{-1})	Temp ($^{\circ}\text{C}$)	X_t (g L^{-1})	P(3HB) (g L^{-1})	Acúmulo P(3HB) (%)
1	6,1	6,1	30	5,5	0,74	13,40
2	23,9	6,1	30	5,3	0,84	15,93
3	6,1	23,9	30	7,8	2,72	34,90
4	23,9	23,9	30	6,9	2,07	28,25
5	6,1	6,1	36	5,9	1,31	22,16
6	23,9	6,1	36	6,1	1,51	24,76
7	6,1	23,9	36	9,3	3,99	42,86
8	23,9	23,9	36	9,2	3,89	42,33
9	15	15	28	6,6	2,15	32,52
10	15	15	38	9,6	6,89	71,74
11	15	0	33	1,2	0,32	26,43
12	15	30	33	10,9	5,26	48,26
13	0	15	33	7,0	2,13	30,38
14	30	15	33	8,8	3,26	37,06
15	15	15	33	8,6	3,07	35,73
16	15	15	33	8,5	3,31	38,96
17	15	15	33	8,7	3,68	42,31

Na Tabela 8 está apresentada a análise de variância (ANOVA) para a produção de P(3HB). Estão demonstradas a soma quadrática, os graus de liberdade, a média quadrática, o F calculado e a probabilidade dos valores serem significativos ($p < 0,05$) para cada variável e suas interações. Por meio da estimativa do p-valor fornecido pela ANOVA, verificou-se que das variáveis testadas, quando analisadas individualmente, apenas a concentração de açúcar invertido e a temperatura de incubação exercem influência significativa na produção de P(3HB). A concentração de glicerol e as interações não foram estatisticamente significativas.

Tabela 8. Análise de variância (ANOVA) dos valores obtidos para a produção de P(3HB).

Fatores	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Glicerol (g L ⁻¹) (L)	0,15972	1	0,15972	0,13279	0,726317
Glicerol (g L ⁻¹) (Q)	2,82548	1	2,82548	2,34899	0,169229
Açúcar invertido (g L⁻¹) (L)	20,15362	1	20,15362	16,75492	0,004612
Açúcar invertido (g L ⁻¹) (Q)	2,45919	1	2,45919	2,04448	0,195837
T (°C) (L)	11,05952	1	11,05952	9,19444	0,019054
T (°C) (Q)	0,23435	1	0,23435	0,19483	0,672239
Interação glicerol x açúcar invertido	0,13787	1	0,13787	0,11462	0,744875
Interação glicerol x T	0,05327	1	0,05327	0,04429	0,839318
Interação açúcar invertido x T	0,42664	1	0,42664	0,35469	0,570215
Erro	8,41994	7	1,20285		
Soma dos quadrados total	46,22441	16			

Valores em negrito = estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Os coeficientes e suas interações fazem parte do modelo para compor a superfície de resposta, e estão apresentados na Equação 8.

$$P(3HB) = \mathbf{3,435} + 0,108*[G] - 0,501*[G]^2 + \mathbf{1,215*[Ai]} - 0,468*[Ai]^2 + \mathbf{0,900*T} + 0,144*T^2 - 0,131*[G]*[Ai] + 0,082*[G]*T + 0,231*[Ai]*T \quad (\text{Equação 8})$$

onde: P(3HB): concentração de poli(3-hidroxibutirato); [G]: concentração de glicerol (g L^{-1}); [Ai]: concentração de açúcar invertido (g L^{-1}); T: temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$). Os valores em negrito representam os valores estatisticamente significativos. Como o modelo é preditivo na região experimental, estão apresentadas na Figura 13 as superfícies de resposta para a produção de P(3HB) em relação à concentração de açúcar invertido e à temperatura de incubação, dentro do intervalo testado, mantendo a concentração de glicerol em 0 g L^{-1} (13a) e 15 g L^{-1} (13b).

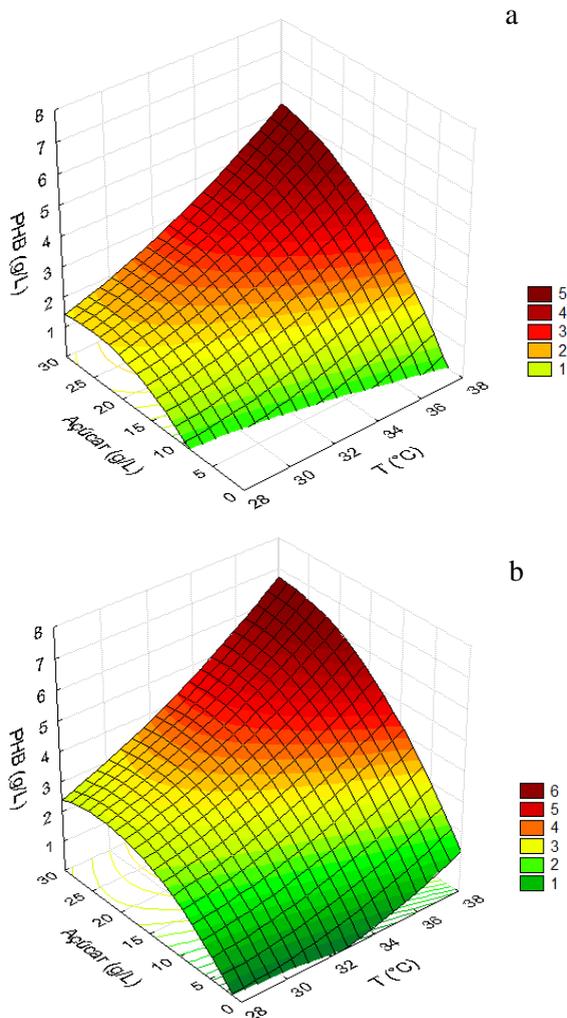


Figura 13. Superfícies de resposta para produção de P(3HB) em relação à concentração de açúcar invertido (g L^{-1}) e à temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$). (a) sem glicerol e (b) concentração de glicerol igual a 15 g L^{-1} .

Como pode ser observado nas Figuras 13a e 13b, a temperatura de incubação exerce influência significativa na produção do polímero. Schneider (2006) já havia observado em seu trabalho, utilizando o mesmo meio de cultura, porém adicionado de óleos vegetais ao invés de

glicerol, que um incremento na temperatura de 30 para 37 °C elevava a produção de P(3HB). Pode-se verificar que, quando o glicerol está presente numa concentração de 15 g L⁻¹ (Figura 13b) chega-se a uma produção de 6,9 g L⁻¹ contra 5,3 g L⁻¹, na melhor condição, sem o acréscimo de glicerol, mesmo não sendo estatisticamente significativa a concentração de glicerol. Com relação ao acúmulo percentual de P(3HB), resultados semelhantes foram obtidos. Na Tabela 9, está apresentada a análise de variância para o acúmulo percentual de P(3HB).

Tabela 9. Análise de variância (ANOVA) demonstrando a variação significativa do acúmulo percentual de P(3HB) no interior das células de *C. necator*.

Fatores	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Glicerol (g L ⁻¹) (L)	6,154	1	6,1538	0,056641	0,818703
Glicerol (g L ⁻¹) (Q)	258,735	1	258,7353	2,381433	0,166693
Açúcar invertido (g L⁻¹) (L)	867,096	1	867,0961	7,980864	0,025587
Açúcar invertido (g L ⁻¹) (Q)	138,757	1	138,7566	1,277134	0,295664
T (°C) (L)	815,916	1	815,9157	7,509793	0,028901
T (°C) (Q)	33,419	1	33,4188	0,307591	0,596429
Interação glicerol x açúcar invertido	18,954	1	18,9537	0,174453	0,688698
Interação glicerol x T	4,808	1	4,8079	0,044253	0,839376
Interação açúcar invertido x T	2,477	1	2,4774	0,022802	0,884233
Erro	760,528	7	108,6469		
Soma dos quadrados total	2958,539	16			

Valores em negrito = estatisticamente significativos (p < 0,05)

Foram significativos para o percentual de acúmulo de P(3HB) os mesmos fatores que foram significativos para a produção do polímero, ou seja, a concentração de açúcar invertido e a temperatura de incubação. Os coeficientes e suas interações fazem parte do modelo para compor a superfície de resposta, e estão apresentados na Equação 9.

$$\begin{aligned} \text{Acúmulo} = & \mathbf{39,874} + 0,672*[G] - 0,487*[G]^2 + \mathbf{7,972*[Ai]} - \\ & 3,513*[Ai]^2 + \mathbf{7,733*T} + 1,724*T^2 - 1,539*[G]*[Ai] + \\ & 0,775*[G]*T + 0,556*[Ai]*T \end{aligned} \quad (\text{Equação 9})$$

Pelo modelo preditivo, pode-se construir as superfícies de resposta para o acúmulo percentual de P(3HB) em relação à concentração de açúcar invertido e à temperatura de incubação, mantendo a concentração de glicerol em 0 g L^{-1} (Figura 14a) e 15 g L^{-1} (Figura 14b).

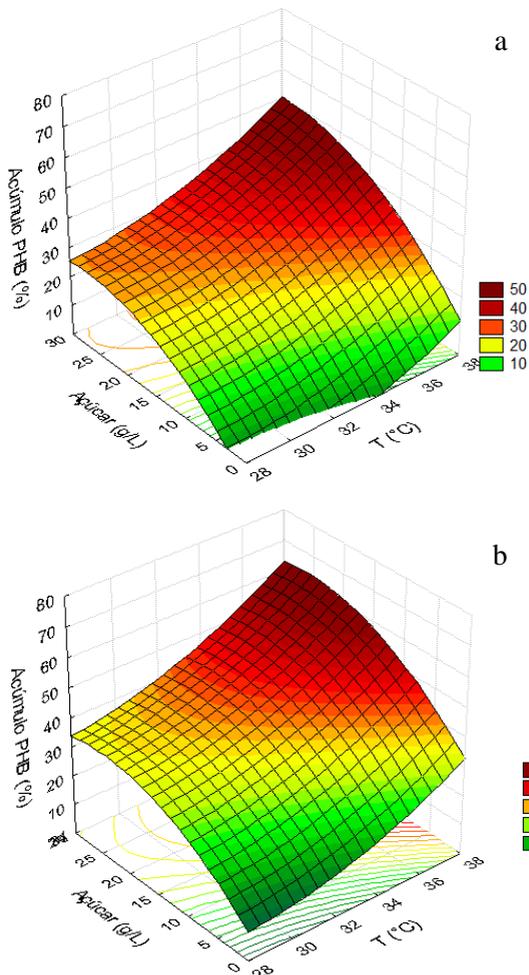


Figura 14. Superfícies de resposta para o acúmulo de P(3HB) (%) em relação à concentração de açúcar invertido (g L^{-1}) e a temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$). (a) sem glicerol e (b) concentração de glicerol igual a 15 g L^{-1} .

Ao adicionar-se 15 g L^{-1} de glicerol, o percentual de acúmulo de P(3HB) passa de 50 para 65 %, acúmulo semelhante ao encontrado por Cavalheiro *et al.* (2009) que obteve 62 % de acúmulo utilizando o

mesmo micro-organismo em processo de batelada alimentada tendo glicerol como única fonte de carbono.

4.3 Validação do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Por meio da análise do delineamento, chega-se como condição ótima a ser validada, em triplicata, a temperatura no nível axial superior (38 °C) e a concentração de açúcar invertido também no nível axial superior (30 g L⁻¹) e glicerol no nível axial inferior (sem glicerol), uma vez que a análise de variância mostra que a concentração de glicerol não exerce influência significativa nem na produção de P(3HB) nem no acúmulo percentual do polímero nas células. Mesmo não tendo indicado a adição de glicerol como uma variável significativa, não se pode negar que um incremento de 15 % na produção do polímero não seja interessante do ponto de vista operacional na fase de extração desse polímero. Soma-se a isto, não se saber até esse momento qual é a real contribuição da adição do glicerol em termos de propriedades que o polímero pode adquirir, uma vez que o volume de meio nos frascos de Erlenmeyer não é suficiente para a extração dos filmes para realização das análises de caracterização térmica e mecânica dos mesmos. Desta forma, optou-se por realizar os ensaios de validação do modelo, em triplicata, não somente com a condição predita como a melhor, mas também as condições que, mesmo não tendo indicado a concentração de glicerol como uma variável significativa, apresentaram predição para a produção de P(3HB) interessantes, que foram essas: 38 °C, 15 g L⁻¹ de açúcar invertido e 15 g L⁻¹ de glicerol e 38 °C, 30 g L⁻¹ de açúcar invertido e 15 g L⁻¹ de glicerol.

Em todos os experimentos de cinética de crescimento microbiano e produção de P(3HB) realizados em frascos agitados, os valores de concentração inicial de açúcar invertido foram um pouco inferiores aos valores dos quais tinha-se a intenção de iniciar o processo. Isso ocorreu porque foi adquirido um grande lote de glicose que foi repostos nos potes de glicose anteriormente utilizados e não se sabia, no momento da realização dos experimentos, que a glicose que estava sendo utilizada tinha apenas 90 % de pureza.

Nas Figuras 15, 16 e 17 estão apresentadas as cinéticas de crescimento de *Cupriavidus necator* DSM 545 e produção de P(3HB) para as condições supramencionadas.

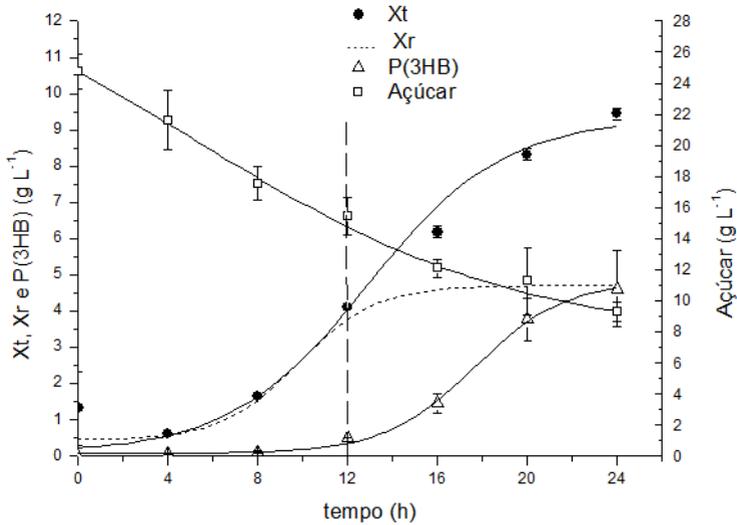


Figura 15. Cinética, em frascos agitados, do crescimento de *Cupriavidus necator* DSM 545 e produção de P(3HB) a 38 °C, utilizando 30 g L⁻¹ de açúcar invertido como substrato. (●) biomassa total (Xt), (Δ) produção de P(3HB), (---) biomassa residual (Xr), (□) concentração de açúcar invertido (Açúcar).

No cultivo de *C. necator* sem a presença de glicerol no meio de cultivo, a fase exponencial de crescimento foi até 12 h de cultivo, com velocidade específica de crescimento de 0,22 h⁻¹ (Figura A4e - Anexos). Chegou-se a limitação em nitrogênio em 12 h de cultivo (representado pela linha tracejada vertical, na figura 15) quando é possível observar que as células cessam o seu crescimento e passam somente a utilizar o substrato para sua manutenção e acúmulo do polímero no seu interior, o que pode ser claramente observado pela curva da biomassa residual ($X_r = X_t - P(3HB)$). Esse comportamento é típico dessa bactéria frente à limitação de nitrogênio e já foi observado por diversos autores (MARANGONI *et al.*, 2000; SQUIO, 2003; SCHNEIDER, 2006; GARCIA, 2006). Concentrações abaixo de 0,2 g L⁻¹ de nitrogênio já permitem o acúmulo de P(3HB) durante a fase de crescimento não limitado. Neste trabalho, foi possível observar produção de P(3HB) a partir de cerca de 10 h de cultivo. A produção de P(3HB) chegou a $4,6 \pm 1,0$ g L⁻¹ o que representa um acúmulo total de 48,9 % de P(3HB) no

interior das células após 24 h. Schneider (2006), analisando os resultados obtidos em seus ensaios, observou duas fases características: a fase de crescimento celular, sem limitação de nitrogênio onde o aumento da massa celular resulta quase que totalmente do aumento da biomassa residual. A duração da fase de crescimento foi variável de acordo com a estratégia utilizada pela autora. Ainda, segunda ela, a produção de P(3HB), nessa fase, foi negligenciável. E a segunda fase é a fase de produção do polímero. Nesta fase o aumento da biomassa total é resultado do aumento da concentração de polímero no interior da célula, pois não evidenciase aumento da biomassa residual.

O substrato foi consumido durante todo o cultivo, restando no meio cerca de 9 g L^{-1} de açúcar invertido, o que leva a um fator de conversão igual a $0,69 \text{ g P(3HB)}$ por g de açúcar invertido. A produtividade global em P(3HB) foi de $0,20 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Se levarmos em conta somente a fase de produção do polímero, a produtividade em polímero chega a $0,36 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, produtividade semelhante àquela encontrada por Garcia (2006) em seu trabalho que foi de $0,39 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de P(3HB), em cultivo a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, com a mesma concentração inicial de açúcar invertido, porém com pulso de açúcar quando o cultivo chegava à limitação de nitrogênio.

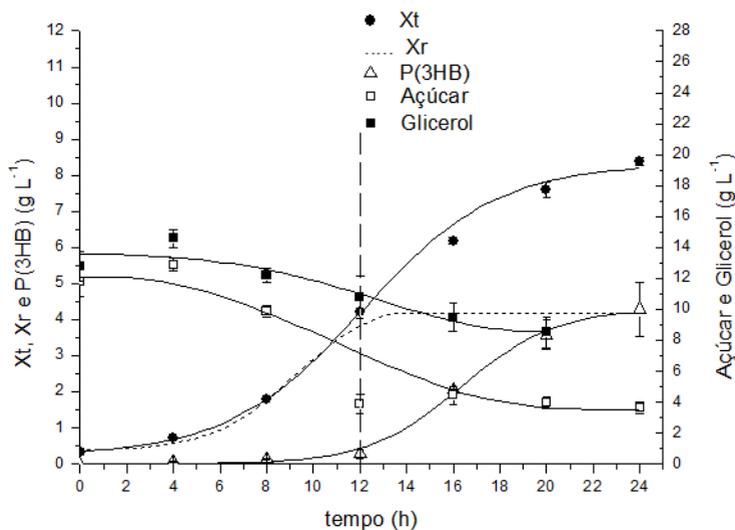


Figura 16. Cinética de crescimento de *Cupriavidus necator* DSM 545 e produção de P(3HB) a 38 °C, utilizando 15 g L⁻¹ de açúcar invertido e 15 g L⁻¹ de glicerol como substrato. (●) biomassa total (Xt), (△) produção de P(3HB), (---) biomassa residual (Xr), (□) concentração de açúcar invertido (Açúcar), (■) concentração de glicerol.

Comportamentos bem semelhantes podem ser observados nas curvas de crescimento e produção de P(3HB) quando 15 g L⁻¹ de açúcar invertido e 15 g L⁻¹ de glicerol foram usados como substrato (Figura 16). Nesta situação, a fase de crescimento exponencial também durou até 12 h de cultivo (Figura A5e - Anexos) e a limitação em nitrogênio também ocorreu nesse mesmo tempo de cultivo. A velocidade específica de crescimento foi de 0,21 h⁻¹, valor um pouco inferior ao encontrado por Mothes *et al.* (2007) que, utilizando 3 g L⁻¹ de glicerol puro como substrato em frascos Erlenmeyer, chegou a uma velocidade específica de crescimento de 0,25 h⁻¹. Na segunda fase de cultivo, que ocorreu após a exaustão de nitrogênio, a produção de P(3HB) foi acentuada, alcançando 4,3 ± 0,8 g L⁻¹ o que representa um acúmulo total de 51,1 % de P(3HB) no interior das células após 24 h de processo, enquanto o aumento da biomassa residual tornou-se quase inexistente. O consumo de açúcar iniciou um pouco antes do consumo de glicerol. Em seguida, os dois substratos foram consumidos durante o mesmo período. Como o substrato residual que ficou no meio foi em torno de 4 g L⁻¹ de açúcar invertido e 8 g L⁻¹ de glicerol, o fator de conversão foi de 0,59 g de P(3HB) por g de substrato (açúcar invertido + glicerol), valor bem superior aos encontrados por Nickel *et al.* (2008) que obtiveram 0,21 g de P(3HB) por g de glicerol, para o cultivo de *E. coli* mutante. Ibrahim e Steinbüchel (2010) que obtiveram 0,29 ± 0,3 g de P(3HB) por g de glicerol cultivando *Zobellella denitrificans* e Mothes *et al.* (2007) que obtiveram fator de conversão de glicerol em P(3HB) de 0,14 g g⁻¹ no cultivo de *Cupriavidus necator*. Quando o glicerol é utilizado como cosubstrato observa-se que o fator de conversão de substrato em produto é superior aos obtidos quando o glicerol é utilizado como fonte de carbono principal, independente da forma bruta ou purificada, comparando os resultados deste trabalho aos resultados de outros autores que utilizaram glicerol como única fonte de carbono.

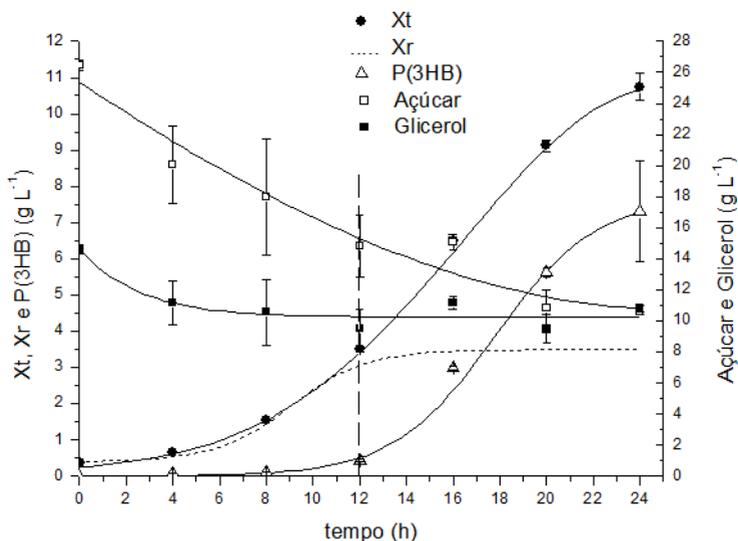


Figura 17. Cinética de crescimento de *Cupriavidus necator* DSM 545 e produção de P(3HB) em frascos agitados a 38 °C, utilizando açúcar invertido 30 g L⁻¹ e 15 g L⁻¹ de glicerol como substrato. (●) biomassa total (Xt), (△) produção de P(3HB), (---) biomassa residual (Xr), (□) concentração de açúcar invertido (Açúcar), (■) concentração de glicerol.

Quando se iniciou o cultivo com 30 g L⁻¹ de açúcar invertido e 15 g L⁻¹ de glicerol como substrato (Figura 17), o micro-organismo cresceu a uma velocidade específica menor (0,18 h⁻¹) do que nas outras duas condições avaliadas. A fase de crescimento exponencial durou o mesmo tempo que os outros dois experimentos (12 h). A limitação em nitrogênio também ocorreu em 12 h de cultivo. Nesse cultivo a biomassa residual foi de 3,4 ± 1,2 g L⁻¹, valor inferior ao encontrado nas outras duas condições avaliadas. A concentração de P(3HB) máxima alcançada foi de 7,3 ± 1,4 g L⁻¹, o que representou um acúmulo de 68,0 % de P(3HB) no interior das células, valor superior ao das outras duas condições e também superior ao de outros autores Cavalheiro *et al.* (2009) chegou a 62 % de acúmulo utilizando o mesmo micro-organismo e glicerol comercial como substrato, Mothes *et al.* (2007) conseguiram chegar a um acúmulo de 58 a 60 % também com *C. necator* e glicerol como substrato. Os dois substratos foram consumidos desde o início do

cultivo diferentemente do que ocorreu com o cultivo contendo 15 g L^{-1} de cada um dos substratos. Logo após 5 h de cultivo o glicerol praticamente não foi mais consumido e somente o açúcar invertido continuou a ser consumido. Como substrato residual ficou no meio em torno de 10 g L^{-1} de cada um dos substratos inicialmente colocados no meio (açúcar invertido e glicerol), o fator de conversão foi de $0,58 \text{ g}$ de P(3HB) por g de substrato (açúcar invertido + glicerol), valor bem superior ao encontrado por Mothes *et al.* (2007), que obteve $0,14 \text{ g}$ de P(3HB) por g de glicerol utilizando o mesmo micro-organismo.

Na Tabela 10 estão apresentados alguns parâmetros cinéticos para os três ensaios feitos na validação do delineamento composto central rotacional. Na Figura 18, está um comparativo entre os valores preditos pelo modelo e os obtidos experimentalmente para a produção e o acúmulo de P(3HB).

Tabela 10. Valores de biomassa, concentração de P(3HB), acúmulo percentual de P(3HB), produtividade em células, produtividade em P(3HB), fatores de conversão de substrato em células e substrato em P(3HB) obtidos no cultivo de *C. necator* em frascos agitados utilizando diferentes concentrações da fonte de carbono no meio. Os valores representam as médias \pm erro padrão

Parâmetro cinético	Ensaio		
	30 g L ⁻¹ de açúcar invertido	15 g L ⁻¹ de açúcar invertido e 15 g L ⁻¹ de glicerol	30 g L ⁻¹ de açúcar invertido e 15 g L ⁻¹ de glicerol
Xt (g L ⁻¹)	9,4±0,2	8,4±0,1	10,7±0,4
Xr (g L ⁻¹)	4,8±1,1	4,1±0,7	3,4±1,2
P(3HB) (g L ⁻¹)	4,6±1,0	4,3±0,8	7,3±1,4
Acúmulo P(3HB)(%)	48,9±10,1	51,1±8,1	68,0±5,7
PXr (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0,22	0,18	0,15
P _g P(3HB) (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0,20	0,19	0,32
P _{P(3HB)} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0,36	0,34	0,58
μ _{máx} (h ⁻¹)	0,21	0,21	0,18
Yx/s (g g ⁻¹)	0,17	0,18	0,07
YP(3HB)/s (g g ⁻¹)	0,69	0,59	0,58

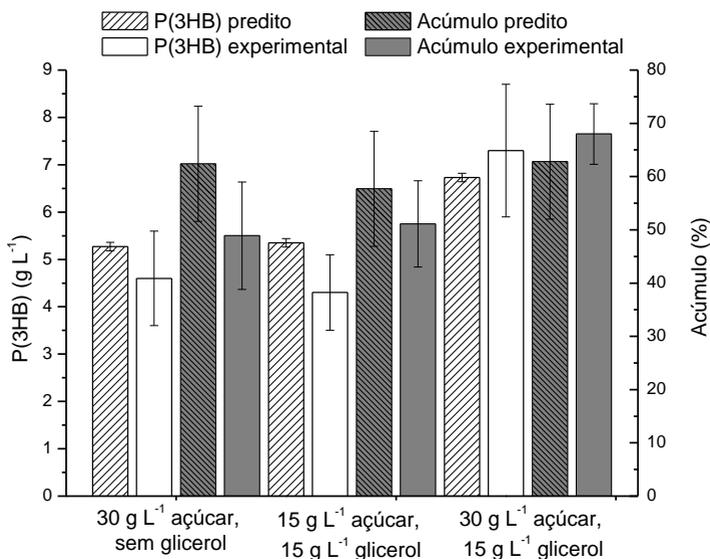


Figura 18. Comparativo entre os valores preditos pelo modelo para a produção de P(3HB) e acúmulo percentual do polímero comparado aos valores obtidos experimentalmente no cultivo de *C. necator* a 38 °C variando as concentrações de açúcar invertido e glicerol.

Como podem ser observados na Figura 18 os valores preditos para o acúmulo de P(3HB) são confirmados experimentalmente, quando se leva em conta o erro experimental. Já para os valores de produção de P(3HB), o modelo foi confirmado experimentalmente para as duas condições em que a concentração inicial de açúcar foi de 30 g L^{-1} , com e sem glicerol. Somente para o cultivo em que havia 15 g L^{-1} de cada um dos substratos, os valores preditos e observados experimentalmente diferiram em 3 %, contando com a margem de erro experimental.

O experimento com 15 g L^{-1} de cada um dos substratos foi o que levou à menor produção de P(3HB) e também ao menor acúmulo de polímero no interior da célula. Essa condição favoreceu o crescimento celular, mas não o acúmulo de polímero, mesmo em limitação de nitrogênio. Os valores de produtividade em célula que para essa condição foi de 0,18 $\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ enquanto que para as outras duas

condições avaliadas onde havia 30 g L^{-1} de açúcar invertido foi de $0,22 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ sem glicerol no meio e $0,15 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ com 15 g L^{-1} de glicerol no meio. Já a produtividade global em P(3HB) foi de $0,20 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para a condição em que havia 15 g L^{-1} de cada um dos substratos, $0,19 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $0,32 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para 30 g L^{-1} de açúcar invertido sem glicerol e com 15 g L^{-1} de glicerol, respectivamente, no meio de cultura inicial.

Devido ao fato dos valores de produtividade em polímero, produção e acúmulo de P(3HB) serem maiores para a condições que iniciou com 30 g L^{-1} de açúcar invertido e 15 g L^{-1} de glicerol, os ensaios em ampliação de escala foram realizados nessa condição. Para saber se a adição de glicerol causava alguma influência no polímero obtido, os ensaios de ampliação da escala em biorreator de 2 L, contendo 1,5 L de meio foram conduzidos na condição supra citada e ainda na mesma condição, porém excetuando-se o glicerol do meio. As condições dos ensaios realizados em biorreator foram: $38 \text{ }^\circ\text{C}$, com agitação de 400 a 1000 min^{-1} , não deixando a $p\text{O}_2$ baixar de 20 %, com e sem glicerol, e ainda utilizando glicerol bruto proveniente da transesterificação de biodiesel proveniente de síntese por rota etílica e metílica (da PUCRS e da UNIVILLE).

4.3 Ensaios em biorreator

Os cultivos de *Cupriavidus necator* DSM 545 foram realizados em biorreator de 2 L contendo 1,5 L de meio. Todos os cultivos foram conduzidos a $38 \text{ }^\circ\text{C}$ em meio mineral. Na Figura 19, está ilustrada a cinética do cultivo realizado em meio contendo 30 g L^{-1} de açúcar invertido e 15 g L^{-1} de glicerol purificado (AI/GP). Na Figura 20, está apresentada a cinética do cultivo realizado em meio com 30 g L^{-1} de açúcar invertido (AI/SG) e na Tabela 11 estão relacionados os dados cinéticos dos ensaios em biorreator.

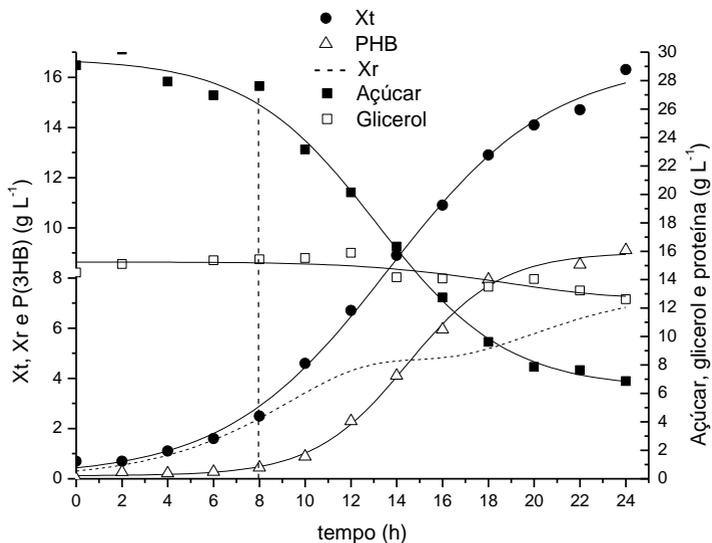


Figura 19. Cinética de crescimento de *Cupriavidus necator* em biorreator e produção de P(3HB) a 38 °C, utilizando 30 g L⁻¹ de açúcar invertido e 15 g L⁻¹ de glicerol como substrato (AI/GP). (●) biomassa total (Xt), (△) produção de P(3HB), (---) biomassa residual (Xr), (■) concentração de açúcar invertido (Açúcar), (□) concentração de glicerol.

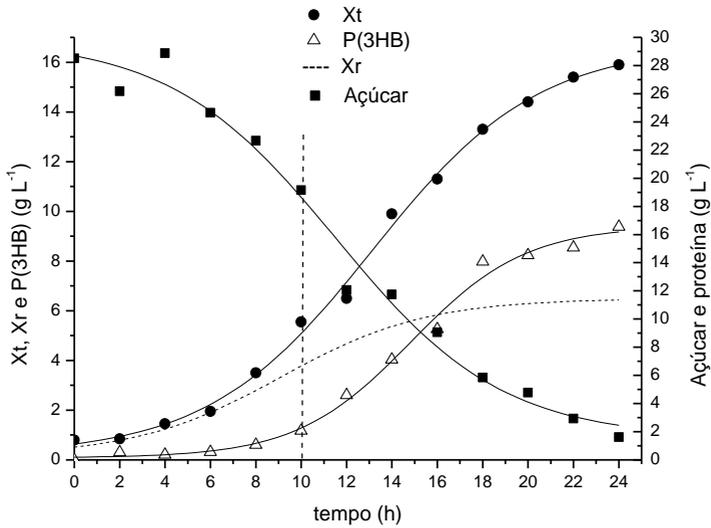


Figura 20. Cinética de crescimento de *Cupriavidus necator* em biorreator e produção de P(3HB) a 38 °C, utilizando 30 g L⁻¹ de açúcar invertido como substrato (AI/SG). (●) biomassa total (X_t), (△) produção de P(3HB), (---) biomassa residual (X_r), (■) concentração de açúcar invertido (Açúcar), (□) concentração de glicerol.

Tabela 11. Valores de biomassa, concentração de P(3HB), acúmulo percentual de P(3HB), produtividade em células, produtividade em P(3HB), velocidades específicas de crescimento, produção de P(3HB) e consumo de substrato, fatores de conversão de substrato em células e substrato em P(3HB) nos cultivos em biorreator na presença ou ausência de glicerol.

Parâmetro cinético	Ensaio	
	AI/GP	AI/SG
Xt (g L ⁻¹)	13,1	15,9
Xr (g L ⁻¹)	6,1	6,5
P(3HB) (g L ⁻¹)	9,1	9,4
Acúmulo P(3HB)(%)	56,1	59,0
PXr (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0,29	0,22
P _g P(3HB) (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0,44	0,69
PP(3HB) (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0,55	0,61
μ _X (h ⁻¹)	0,19	0,20
μ _{P(3HB)} (h ⁻¹)	0,30	0,29
μ _S (h ⁻¹)	0,10	0,12
YXr/s (g g ⁻¹)	0,50	0,27
YP(3HB)/s (g g ⁻¹)	0,43	0,51

É possível observar nas curvas de biomassa residual ($X_r = X_t - P(3HB)$) dos ensaios AI/SG e AI/GP, que logo após a limitação em nitrogênio, que ocorreu de forma espontânea, as células praticamente pararam de crescer e passaram apenas a acumular P(3HB) em seu interior, comportamento típico da *C. necator* já observado por diversos autores como Garcia (2006), Schneider (2006) e Cavalheiro *et al.* (2009). A curva de consumo de açúcar invertido para o ensaio AI/GP é inicialmente pouco acentuada e a velocidade de consumo é muito lenta durante a fase de crescimento (a esquerda da linha tracejada). A velocidade de consumo na fase de produção do polímero (a direita da linha tracejada) aumenta, já o consumo do glicerol é quase inexistente na fase de crescimento, sendo que, dos 15 g L⁻¹ adicionados, somente 3 g L⁻¹ foi consumido. A quantidade inicial total de substrato nos dois cultivos foi bem distinta e o percentual de substrato residual foi 44,8 e

5,6 % para AI/GP e AI/SG, respectivamente. Isso se deve basicamente ao glicerol, que foi pouco consumido ao longo do cultivo.

A produção e o acúmulo de P(3HB) no interior da célula também foi muito similar 9,1 g L⁻¹ e 56,1 % para AI/GP e 9,4 g L⁻¹ e 59,0 % para AI/SG, com valores de produção 22 e 50 % superiores aos obtidos em *shaker* para as mesmas condições. Os fatores de conversão para o cultivo AI/GP foram de 0,54 g de célula por g de substrato e 0,47 g de P(3HB) por g de substrato, nas respectivas fases de crescimento e produção; enquanto que para o cultivo com AI/SG foi 0,27 g de por grama de substrato para a fase de crescimento e 0,51 g de P(3HB) por g de substrato na fase de produção. Schneider (2006) obteve a 37 °C, sem adição de óleo, um fator de conversão de substrato em P(3HB) de 0,27 g g⁻¹. A produtividade global em P(3HB) foi de 0,44 g L⁻¹ h⁻¹ para AI/GP e 0,69 g L⁻¹ h⁻¹ para AI/SG, valores bem superiores aos encontrados por Schneider (2006) que obteve produtividade em polímero da ordem de 0,27 g L⁻¹ h⁻¹, utilizando o mesmo meio de cultivo (MM com açúcar invertido como fonte de carbono) com uma temperatura muito próxima da utilizada nesse estudo. Cavalheiro *et al.* (2009) cultivando *C. necator* em batelada alimentada, chegou a uma produtividade de 1,65 g L⁻¹ h⁻¹; utilizando *E. coli* recombinante em batelada alimentada e condições otimizadas. Nikel *et al.* (2008) atingiram produtividade em P(3HB) de 0,18 g L⁻¹ h⁻¹. A velocidade específica de crescimento e de produção de P(3HB), respectivamente, foi de 0,19 h⁻¹ e 0,30 h⁻¹ para AI/GP e 0,20 h⁻¹ e 0,29 h⁻¹ para AI/SG. Dalcanton (2006), modelando o crescimento microbiano a diferentes temperaturas e utilizando o mesmo micro-organismo e meio de cultivo sem glicerol, obteve em seus experimentos a 37,5 °C velocidade específica de crescimento de 0,23 h⁻¹ e a 40 °C velocidade específica de crescimento de 0,35 h⁻¹. Porém a 40 °C as células chegam a somente a pouco mais da metade da população a qual a autora chegou cultivando a 37,5 °C.

Quando glicerol bruto proveniente da manufatura de biodiesel foi utilizado como cosubstrato, a produção de P(3HB) foi medida somente no ponto final do cultivo e foram obtidas concentrações de apenas 0,3 g L⁻¹ no ensaio AI/GB e 0,4 g L⁻¹ para os ensaios AI/Gbm e AI/Gbe. Durante todo o cultivo houve muita dificuldade na amostragem pois, mesmo em forças de centrifugação de 10.000 g, as células não decantavam, ficando na parte superior do *Eppendorf*. As baixas concentrações de biomassa e acúmulo de P(3HB) podem ser atribuídas ao fato do glicerol não ter passado por nenhuma etapa de purificação e conter etanol e metanol, além de sais residuais provenientes da reação da transesterificação, como pode ser observado nos cromatogramas nas

Figuras A1, A2 e A3 no Anexo 1. Mothes *et al.*(2007) utilizaram glicerol de diversas manufaturas de biodiesel da Alemanha na produção de P(3HB) por duas espécies de bactérias (*C. necator* e *Paracoccus denitrificans*), constataram que a presença de íons de sódio, provenientes da produção do biodiesel, foram identificados como tendo efeito negativo, tanto no crescimento celular, quanto no acúmulo do polímero. Não foi observado o consumo dos substratos em nenhum dos ensaios com glicerol bruto (AI/GB, AI/GBm e AI/GBe) e por esse motivo não foram calculados os parâmetros cinéticos para essas bateladas.

Posada *et al.* (2012) realizaram um amplo estudo de casos para o uso do glicerol, subproduto da produção do biodiesel, avaliando o custo final dos produtos manufaturados a partir do glicerol. Um dos casos avaliados pelos autores em seu artigo foi o uso do glicerol na produção de P(3HB) por *C. necator* JPM 134 em dois estágios de fermentação e avaliaram o processo de *downstream* por três diferentes métodos de extração. Em todos os processos de *downstream*, foram obtidos P(3HB) com 99,9 % em massa obtido por *spray drying*. Dois substratos foram testados: glicerol bruto a 88 % de pureza e purificado com 98 % de pureza. Em todos os casos o custo da matéria prima foi representado pelos custos de purificação do glicerol. O custo de purificação do glicerol ficou entre 4,8 e 5,6 % do total dos custos de produção do PHB quando o glicerol com 88 % de pureza foi utilizado. Esse percentual aumenta para 6,3 a 7,7 % quando glicerol a 98 % de pureza foi utilizado. De maneira geral, menores custos de produção foram obtidos quando glicerol com 98 % de pureza foi utilizado no processo fermentativo, devido aos maiores rendimentos em P(3HB) no estágio de fermentação e às menores exigências energéticas no processo de *spray drying*. O custo total de produção de P(3HB) ficou entre 2,11 e 2,44 US\$ kg⁻¹ quando foi utilizado glicerol a 88 % de pureza e entre 1,94 e 2,38 US\$ kg⁻¹ para o glicerol a 98 % de pureza. Sendo assim, é mais viável produzir P(3HB) a partir de glicerol purificado ao invés de glicerol bruto.

4.4 Caracterização dos filmes de P(3HB) sintetizados em biorreator

Dentre os fatores que interferem na formação do biopolímero, a fonte de carbono, utilizada no cultivo, exerce uma grande influência tanto na composição do polímero quanto nas suas características. Assim, neste capítulo, buscou-se avaliar as propriedades de filmes de P(3HB), obtidos do cultivo em biorreator com glicerol puro (AI/GP) e sem a

presença de glicerol (AI/SG), sendo que nos cultivos com glicerol bruto de rota metilica (AI/GBm) e de rota etilica (AI/GBe) não foi produzido polímero suficiente para extração e formação dos filmes. Os filmes poliméricos foram caracterizados pelas técnicas de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difratometria de raios-X (DRX), análise termogravimétrica (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC), ensaios mecânicos sob tensão e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4.4.1. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR para os polímeros sintetizados com e sem a presença de glicerol puro podem ser visualizados nas Figuras 21a e 21b, respectivamente. Observa-se que os espectros são muito semelhantes quando sobrepostos. Em ambas as amostras foram detectados os picos característicos do P(3HB), que estão relacionados na Tabela 12.

Foram observados os picos referentes às deformações axiais simétrica e assimétrica da ligação C-H em 2933 e 2977 cm^{-1} ; à deformação axial da carbonila (C=O) em 1719 cm^{-1} , atribuída à vibração da carbonila do grupo éster no estado cristalino (XU *et al.*, 2002); à deformação angular simétrica no plano dos grupos CH_3 em 1379 cm^{-1} e os picos em 1275 e 1054 cm^{-1} , atribuídos aos estiramentos simétrico e assimétrico, respectivamente, do grupo C-O-C. Estes picos também foram observados por Garcia, 2006 e Xu *et al.*, 2002.

Tabela 12. Relação de picos características no espectro de Infravermelho para os polímeros obtidos com glicerol puro (AI/GP) e sem glicerol (AI/SG), comparados com a literatura.

Atribuições	$1/\lambda(\text{cm}^{-1})$ P(3HB) (AI/GP)	$1/\lambda(\text{cm}^{-1})$ P(3HB) (AI/SG)	$1/\lambda(\text{cm}^{-1})$ literatura
Deformação simétrica e assimétrica da ligação C-H	2933 e 2977	2932 e 2977	2930 e 2988 (GARCIA, 2006)
Deformação axial da carbonila (C=O)	1719	1718	1721 (GARCIA, 2006) 1724 (XU <i>et al.</i> , 2002)
Deformação angular simétrica no plano dos grupos CH_3	1379	1379	1382 (GARCIA, 2006) 1380 (XU <i>et al.</i> , 2002)
Estiramentos simétrico e assimétrico do grupo C-O-C	1275 e 1054	1275 e 1054	1275 e 1051 (GARCIA, 2006)

Observou-se também, em ambos os espectros, um pequeno pico em 3436 cm^{-1} , atribuído ao estiramento OH, indicando a presença de umidade no material. De acordo com Hazimah *et al.* (2003), a presença de glicerol pode ser evidenciada por um pico largo na região de $3500\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$ e 1630 cm^{-1} , constatando a ausência de glicerol residual na amostra obtida a partir de glicerol puro.

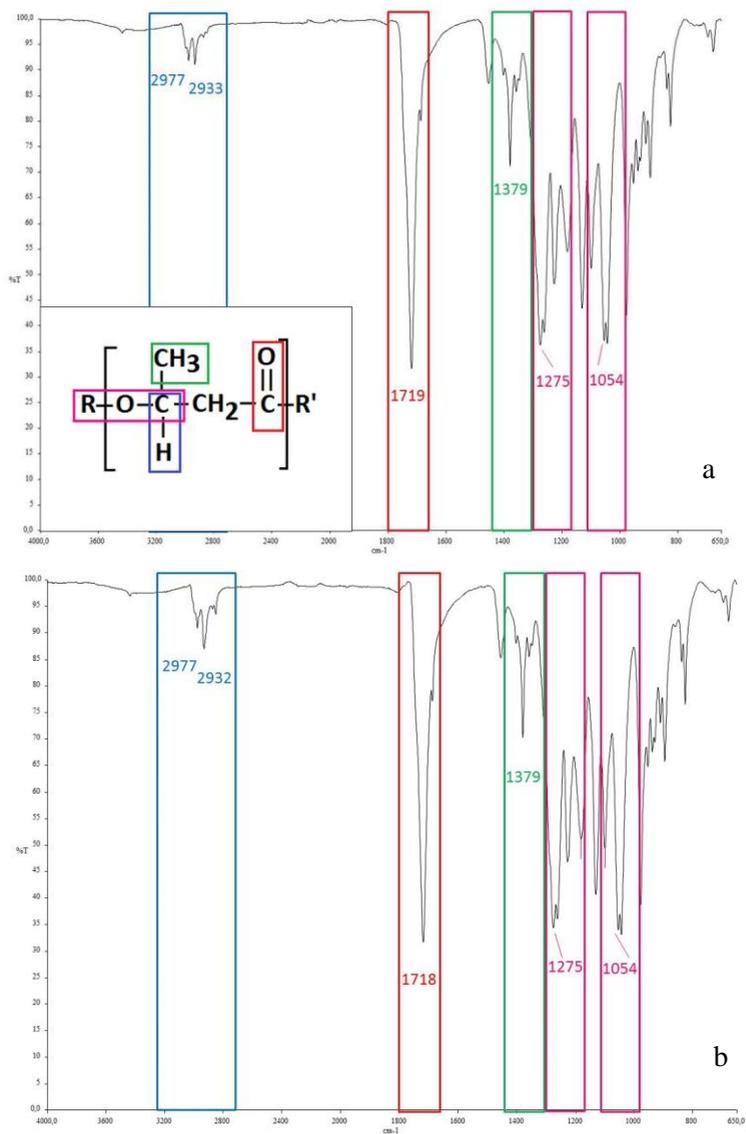


Figura 21. Espectros de FTIR para os filmes de P(3HB): a) Al/GP; b) Al/SG.

4.4.2. Difractometria de raios-X (DRX)

Os difratogramas de raios-X para os polímeros sintetizados com glicerol puro (AI/GP) e sem glicerol (AI/SG) estão apresentados na Figura 22 e os percentuais de cristalinidade determinados a partir dos difratogramas estão mostrados na Tabela 13. Observou-se para ambas as amostras o mesmo perfil de difração, com picos de difração em 2θ igual a $13,5^\circ$ (reflexão 020); 17° (reflexão 110); 20° (reflexão 021); $21,5^\circ$ (reflexão 101); $22,5^\circ$ (reflexão 111); $25,5^\circ$ (reflexão 121); 27° (reflexão 040) e 31° (reflexão 002), característicos do polímero P(3HB) semicristalino, concordando com a literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2006). O grau de cristalinidade determinado para as amostras foi muito semelhante, 60,7 e 61,6 % para o AI/GP e AI/SG, respectivamente (Tabela 13).

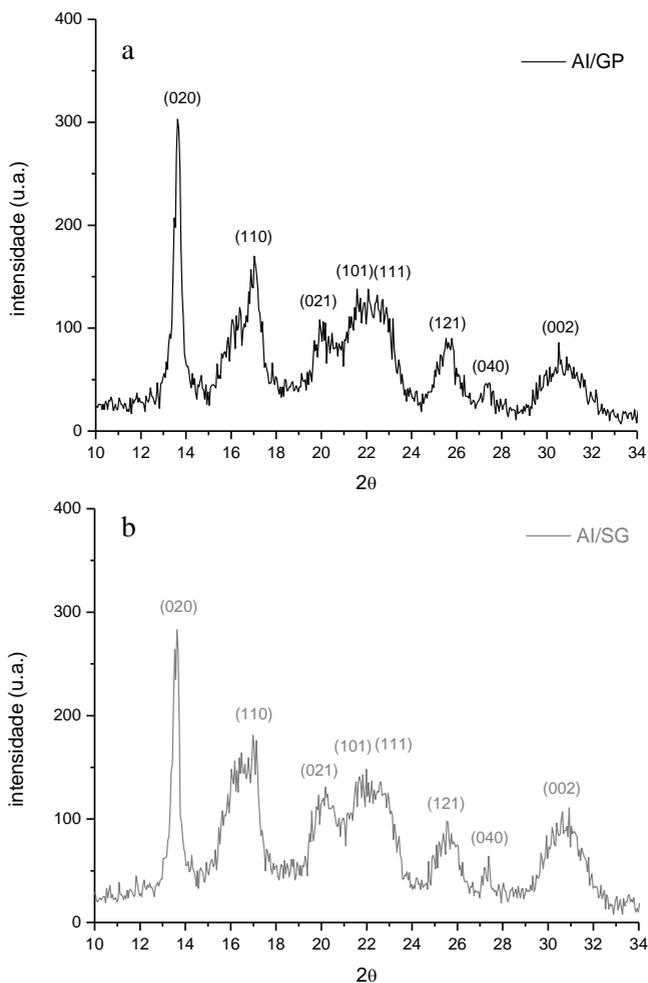


Figura 22. Difratogramas de raios-x dos P(3HB) sintetizados: a) com glicerol puro (AI/GP); b) sem glicerol (AI/SG).

Tabela 13. Dados de grau de cristalinidade para os polímeros sintetizados com glicerol puro (AI/GP) e sem glicerol (AI/SG), determinados por difração de raios-X.

Amostra	Grau de cristalinidade (%)
AI/GP	60,7
AI/SG	61,6

4.4.3. Análise termogravimétrica (TGA)

Na Figura 23 são apresentadas as curvas de TGA dos polímeros sintetizados com glicerol puro (AI/GP) e sem glicerol (AI/SG) e na Tabela 14 estão relacionados os dados determinados a partir destas curvas.

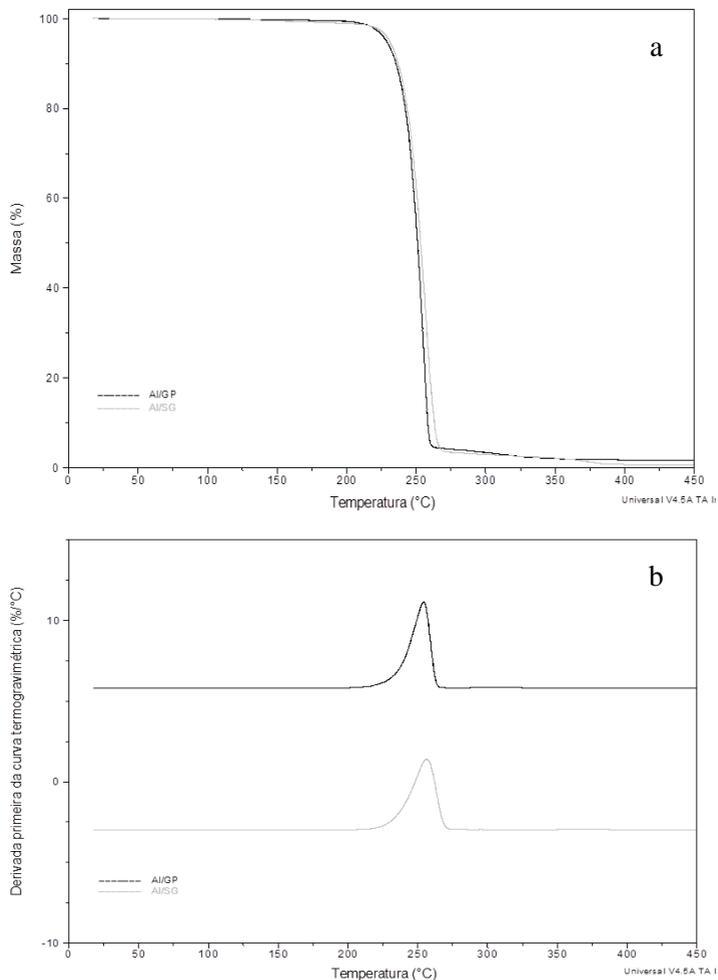


Figura 23. Curvas de TGA do P(3HB) sintetizados com glicerol puro (AI/GP) e sem glicerol (AI/SG): a) termogravimetria (TG); b) termogravimetria derivada (DTG).

Tabela 14. Dados T_{onset} e $T_{\text{máx}}$ obtidos das curvas de TG e DTG para os polímeros sintetizados com glicerol puro (AI/GP) e sem glicerol (AI/SG).

Amostra	T_{onset} (°C)	% perda de massa	$T_{\text{máx}}$
P(3HB) – AI/GP	242,7	98,5	254,2
P(3HB) – AI/SG	242,8	99,4	256,3

As amostras apresentaram perfil de degradação idênticos, com apenas 1 estágio de perda de massa, atribuído à decomposição do P(3HB). As amostras apresentaram a mesma estabilidade térmica, com temperatura de degradação (T_{onset}) igual a 243 °C e temperatura onde a degradação é máxima ($T_{\text{máx}}$) em cerca de 255 °C. Estes valores foram bem inferiores aos encontrados por Duarte (2004) para o P(3HB) com massa molar igual a 300.000 g mol⁻¹, apresentando $T_{\text{onset}} = 270$ °C e $T_{\text{máx}} = 288$ °C e ao P(3HB), onde foram relatados valores de $T_{\text{onset}} = 283$ °C e $T_{\text{máx}} = 307$ °C, ambos obtidos da P(3HB) Industrial.

O P(3HB) é propenso à degradação térmica e decompõe-se por um mecanismo de três etapas, como se observa na Figura 24. Entre 170 a 200 °C são formadas espécies voláteis por um mecanismo de cisão de cadeia aleatória. Entre 200 a 300 °C os oligômeros de P(3HB) são quebrados em unidades monoméricas livres de ácido crotônico. Em temperaturas superiores a 500 °C, apenas as espécies dióxido de carbono e propano são observadas (MOUSAVIOUN *et al.*, 2012).

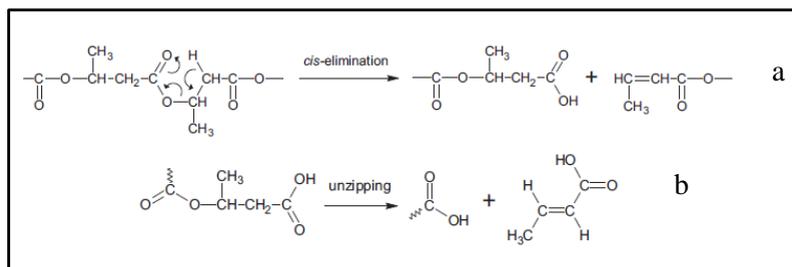


Figura 24. Mecanismo de degradação térmica do P(3HB): a) cisão de cadeia aleatória entre 170 a 200 °C; b) quebra dos oligômeros de P(3HB) entre 200 a 300 °C. Fonte: MOUSAVIOUN *et al.*, 2012.

Além da estabilidade térmica, o TGA também é uma ferramenta importante para avaliar o grau de impurezas decorrentes do processo de síntese e extração do polímero. As impurezas são responsáveis por muitas das propriedades finais dos produtos acabados, como o grau de transparência, odor e brilho, além de contribuírem para cisões de cadeias poliméricas, acarretando em queda das propriedades termomecânicas (NASCIMENTO, 2001). O grau de pureza do polímero sem glicerol (99,4 %), representado pela perda de massa, foi similar ao encontrado por Nascimento (2001) (99,1 %), enquanto o P(3HB) com glicerol apresentou grau de pureza de 98,5 %.

4.4.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As propriedades térmicas de materiais poliméricos semicristalinos são geralmente avaliadas pelos seguintes parâmetros: temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão cristalina (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade ($\square c$), os quais afetam fortemente as aplicações potenciais dos polímeros.

Na Figura 25 podem ser observadas as curvas de DSC dos filmes de P(3HB) sintetizados com glicerol puro (AI/GP) e sem glicerol (AI/SG), sendo que os dados de T_m , entalpia de fusão (ΔH_m) e $\square c$ foram determinados a partir do primeiro aquecimento dessas curvas e a T_g foi determinada a partir do segundo aquecimento (Tabela 15).

Ambos os polímeros sintetizados mostraram o mesmo comportamento apresentando 2 picos endotérmicos, um pico principal e outro pico menor denominado de temperatura de fusão secundária a uma temperatura mais baixa. Os valores de T_m encontrados foram 176,4 e 161,2 °C para o P(3HB) sintetizado com glicerol e 177,0 e 162,6 °C para o P(3HB) sintetizado sem glicerol, concordando com a literatura. Lima (2004) relata que a T_m do P(3HB) geralmente oscila entre 170 e 180 °C. O aparecimento de fusões múltiplas está relacionado à heterogeneidade no tamanho dos cristais, sendo que os cristais menores fundem a temperaturas menores e os cristais maiores fundem a temperaturas maiores.

As entalpias de fusão para os dois polímeros também foram muito similares. Consequentemente, o grau de cristalinidade determinado foi de 60,8 % para o P(3HB) com glicerol e 61,6 % para o polímero sem glicerol, concordando com a literatura. Segundo Doi e Sudesh (2000 *apud* LIMA, 2004), o P(3HB) apresenta alta cristalinidade, variando entre 55 e 80 %.

Os valores de T_g encontrados para os polímeros sintetizados com e sem glicerol foram de $-3,3$ e $5,7$ °C, respectivamente, indicando que o polímero com glicerol apresentou-se mais flexível. De acordo com Anderson e Dawes (1990), a T_g do P(3HB) geralmente varia entre -5 a 5 °C. A T_g está pouco visível nos gráficos apresentados na Figura 25 devido à alta cristalinidade dos polímeros sintetizados.

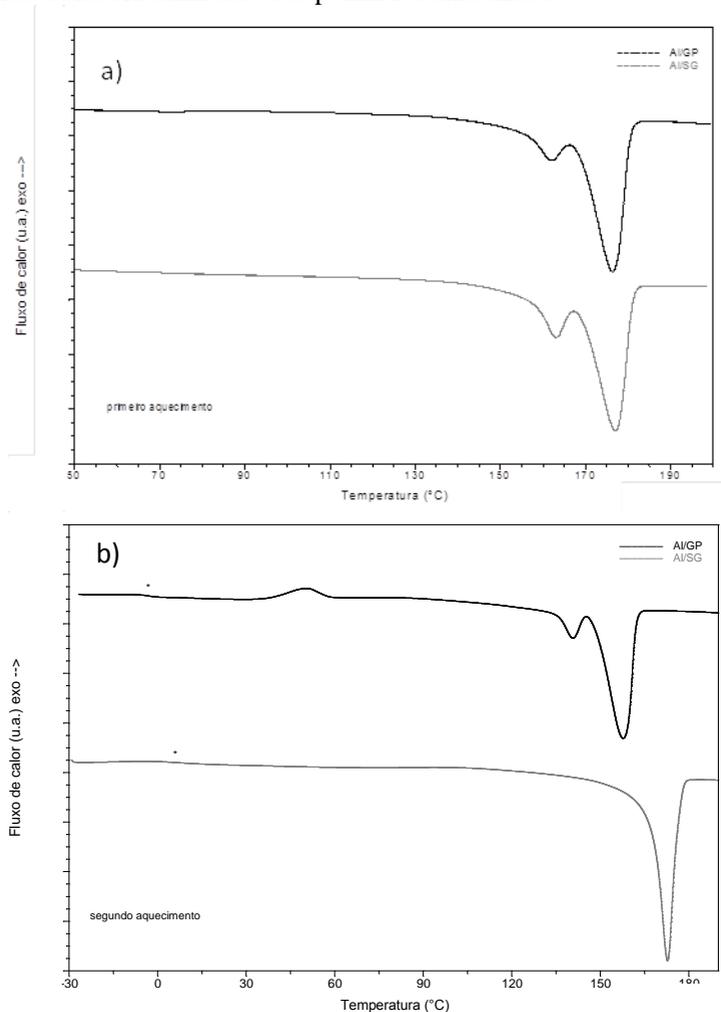


Figura 25. Curvas de DSC para os filmes de P(3HB) sintetizados com glicerol puro (AI/GP) e sem glicerol (AI/SG): a) primeiro aquecimento; b) segundo aquecimento.

Tabela 15. Dados de temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade (α_c) obtidos das curvas de DSC para os polímeros sintetizados com glicerol puro (AI/GP) e sem glicerol (AI/SG).

Amostra	T_g (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (J g⁻¹)	α_c (%)
AI/GP	-3,3	161,2 e 176,4	88,7	60,8
AI/SG	5,7	162,6 e 177,0	90,0	61,6

4.4.5. Ensaio mecânico sob tração

Na Figura 26 estão apresentados os resultados obtidos para o módulo de Young, alongamento na ruptura e tensão máxima para os filmes de P(3HB) sintetizados com glicerol puro (AI/GP) e sem glicerol (AI/SG). Ambas as amostras apresentaram curvas de tensão *versus* deformações típicas de material frágil, ou seja, os corpos de prova romperam logo após o limite de proporcionalidade, sem qualquer escoamento que pudesse ser atribuído à tenacidade.

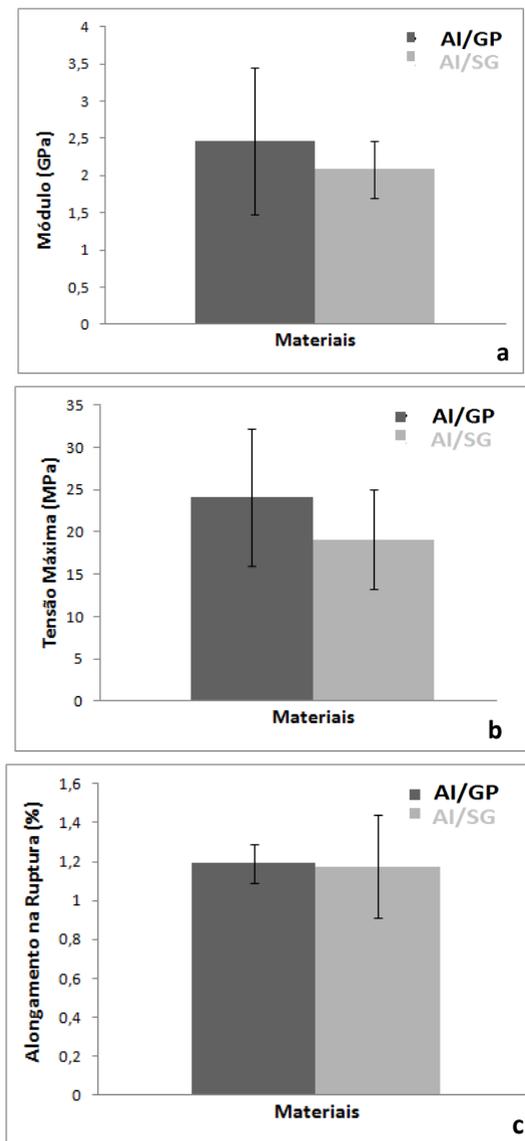


Figura 26. Resultados mecânicos dos filmes de P(3HB) sintetizados com glicerol puro (AI/GP) e sem glicerol (AI/SG): a) módulo de Young; b) alongamento na ruptura; c) tensão máxima.

O módulo de elasticidade (ou módulo de Young) de um polímero está diretamente relacionado com a sua rigidez ou flexibilidade de forma que, quanto mais baixo, maior a flexibilidade do polímero. O módulo de Young encontrado neste trabalho foi de $2,46 \pm 0,98$ GPa para o P(3HB) com glicerol e $2,09 \pm 0,39$ GPa para o P(3HB) sem glicerol, valores esses que devido ao desvio padrão são considerados estatisticamente iguais (Figura 26a). Estes valores se aproximam dos encontrados por Nascimento (2001), que obteve $2,48 \pm 0,24$ GPa e Dobroth *et al.* (2011), que obteve 1,8 GPa. Valores semelhantes também foram observados em outros trabalhos, mas somente com adição de plastificante, que auxilia na diminuição do módulo, tornando o polímero mais flexível, como no trabalho de Duarte (2004), que ao processar P(3HB) com adição de 30 % de PCL, encontrou módulo de elasticidade igual a $2,2 \pm 0,3$ GPa, enquanto Wessler (2007), ao processar P(3HB) com a adição de 10 % de PCL-T 900 obteve $2,0 \pm 0,09$ GPa como o menor valor. Entretanto, os valores obtidos neste trabalho são bem inferiores aos encontrados na literatura, sendo que o módulo de Young para o P(3HB) encontrado por Conti (2006) foi de $4,6 \pm 1,1$ GPa, o encontrado por Wessler (2007) foi de $4,1 \pm 0,5$ GPa, o encontrado por Duarte (2004) foi de $3,8 \pm 0,1$ GPa. Cabe salientar que a massa molar é diretamente proporcional ao módulo, ou seja, um polímero com baixa massa molar geralmente apresenta módulo mais baixo.

O alongamento na ruptura encontrado foi estatisticamente semelhante nos dois polímeros, $1,19 \pm 0,09$ % para o P(3HB) sintetizado com glicerol e $1,17 \pm 0,26$ % para o P(3HB) sem glicerol, mostrando que o polímero deforma muito pouco antes de romper (Figura 26b). De acordo com Dobroth *et al.* (2001) o baixo valor de alongamento pode ser atribuído à baixa massa molar do polímero. Os valores obtidos para os polímeros sintetizados são bem inferiores aos comumente encontrados na literatura. Conti (2006) encontrou alongamento igual a $8,2 \pm 1,1$ %. Parra *et al.*, (2006) obtiveram 9 ± 3 % e Duarte (2004), por outro lado, obteve alongamento de $17,7 \pm 1,9$ %. Nascimento (2001), por outro lado, obteve alongamento de $2,5 \pm 2,0$ %, mas com um desvio padrão muito alto. Dobroth *et al.* (2011) obtiveram 1,3 % e Wessler (2007) obteve alongamento de $0,9 \pm 0,2$ %, valor muito inferior ao geralmente encontrado.

Os valores de tensão máxima obtidos neste trabalho foram $24,05 \pm 8,10$ MPa e $19,12 \pm 5,84$ MPa para os polímeros com glicerol e sem glicerol, respectivamente, que são considerados estatisticamente equivalentes (Figura 26c). Estes valores são superiores ao encontrado por Dobroth (2011), que obteve 14 MPa para o P(3HB) obtido a partir

de glicerol com $308.000 \text{ g mol}^{-1}$ e similares ao encontrado por Duarte (2004), que obteve $24,5 \pm 0,8 \text{ MPa}$ para o P(3HB) da P(3HB) Industrial com $300.000 \text{ g mol}^{-1}$. Conti (2006) encontrou para o P(3HB) com massa molar de $492.000 \text{ g mol}^{-1}$ uma tensão máxima de $26 \pm 2,6 \text{ MPa}$, enquanto Parra *et al.* (2006) encontraram tensão máxima de $28 \pm 3 \text{ MPa}$.

4.5 Biodegradação em solo

A biodegradabilidade dos PHAs em ambientes naturais pode ser observada em diversos ambientes tais como solo, água do mar e de lagos. Segundo Sudesh *et al.* (2000) a biodegradabilidade desses materiais pode ser elucidada por meio do monitoramento da amostra e foi verificado que a taxa de biodegradação depende de vários fatores, principalmente àqueles relacionados ao ambiente (temperatura, umidade, pH e suprimento de nutrientes) e àqueles relacionados ao material em si (composição, cristalinidade, aditivos área superficial). A biodegradação ocorre na superfície pela hidrólise enzimática (erosão da superfície) e a massa molecular da amostra permanece quase inalterada durante a biodegradação.

Antes das amostras serem submetidas ao teste de biodegradação, foram avaliadas as características do solo utilizado nesse trabalho. A atividade microbiana determinada pela técnica de espalhamento apresentou $1,36 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$. O pH estava em 7,0, dentro da faixa estabelecida em norma para realização do teste, portanto, não foi necessário fazer ajuste do mesmo. A umidade do solo foi mantida entre 20 e 30 % (com relação à massa seca). Devido à evaporação, a água perdida durante o experimento foi recolocada sem deformar o solo.

4.5.1 Análise visual

Na Figura 27 estão apresentadas as fotos dos filmes de P(3HB) extraídos das sínteses AI/GP e AI/SG após 0, 7, 14, 21 e 28 dias de degradação em solo. Como pode ser observado, a introdução da amostra no saquinho de *nylon* atrasa em cerca de 7 dias a degradação, pois não é visível a deterioração da amostra nesse tempo, enquanto que Schneider (2006) já observava degradação semelhante, em 7 dias, ao encontrado para o tempo de 14 dias neste trabalho.

A avaliação das alterações visuais nos polímeros pode ser realizada em quase todos os testes. Os indícios utilizados para descrever os efeitos da degradação incluem a rugosidade da superfície, formação de buracos ou fissuras, de fragmentação, alterações na cor ou formação

de biofilmes na superfície. Estas alterações não demonstram a presença de um processo de biodegradação em condições de metabolismo, mas o parâmetro de alterações visuais já pode ser usado como um primeiro sinal de qualquer ataque microbiano. Para a obtenção de informações sobre o mecanismo da degradação, é necessária a realização de observações mais sofisticadas como o MEV e a microscopia de força atômica (MFA) (IKADA, 1999). É possível visualizar que as amostras, tanto de AI/GP quanto AI/SG, são degradadas a uma velocidade elevada, com 35 dias de degradação praticamente não existe mais amostra no saquinho, como poderá ser melhor evidenciado nas análises subsequentes. Quando as amostras foram desenterradas era possível observar colonização por fungos e bactérias. Com o decorrer do tempo de degradação, foi possível notar um aumento nas trincas, rachaduras e nos orifícios encontrados nas amostras, até que no tempo de 28 dias, as amostras já estavam muito fragmentadas, o que impossibilitou a realização da análise de DRX.

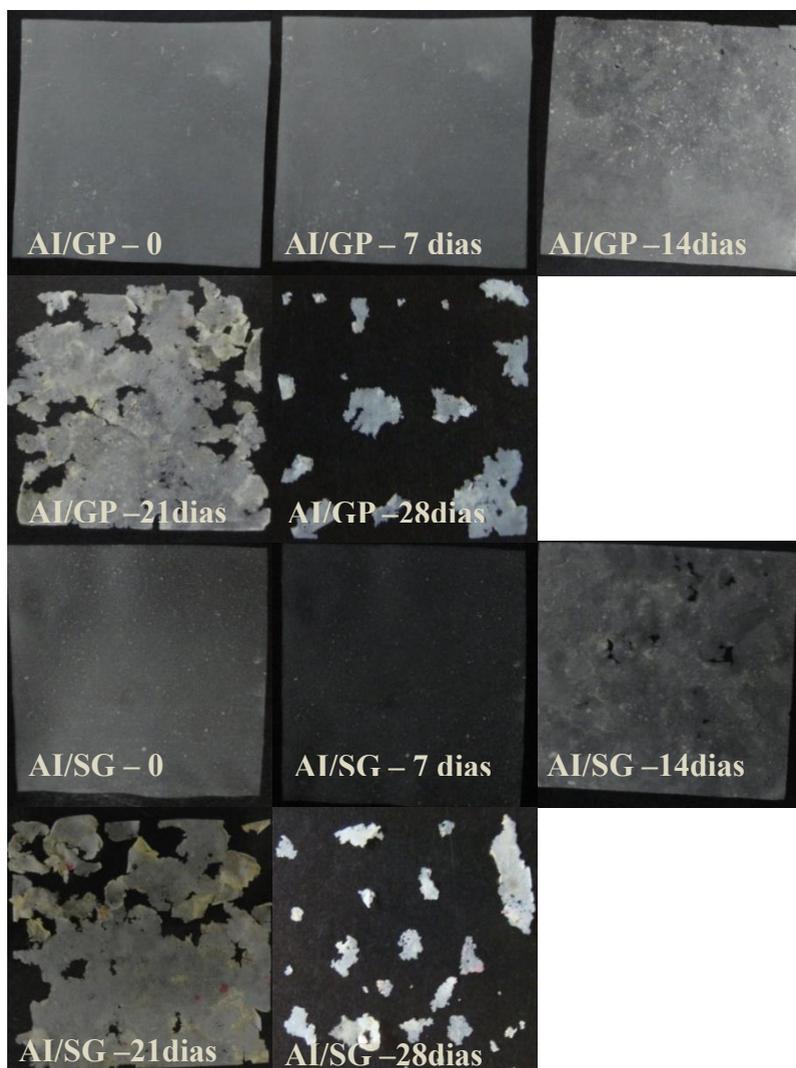


Figura 27. Fotos das amostras AI/GP e AI/SG após 0, 7, 14, 21 e 28 dias de biodegradação em solo.

4.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia dos filmes obtidos nos bioprocessos AI/GP e AI/SG, observadas por MEV com aumento de 100 e 1000 vezes, estão ilustradas nas Figuras 28 e 29, respectivamente. Como pode ser observado nas figuras, entre 0 e 7 dias de degradação, as micrografias para as duas amostras são praticamente iguais, não sendo possível evidenciar sinais de início da degradação até o 7^o dia. A partir de 14 dias já é possível observar sinais claros de que as amostras começaram a ser degradadas. Para a amostra AI/GP com 14 dias de degradação são observadas erosões na superfície do filme, que não chegaram a romper como no caso da amostra do filme AI/SG que nesse tempo já apresentava alguns pequenos orifícios. Wang *et al.* (2004) sugerem que a biodegradação do P(3HB) se processa por um mecanismo de erosão da superfície do polímero. A partir de 21 dias, as amostras já estão claramente deterioradas, sendo possível observar trincas e diversos orifícios e fragmentação das amostras.

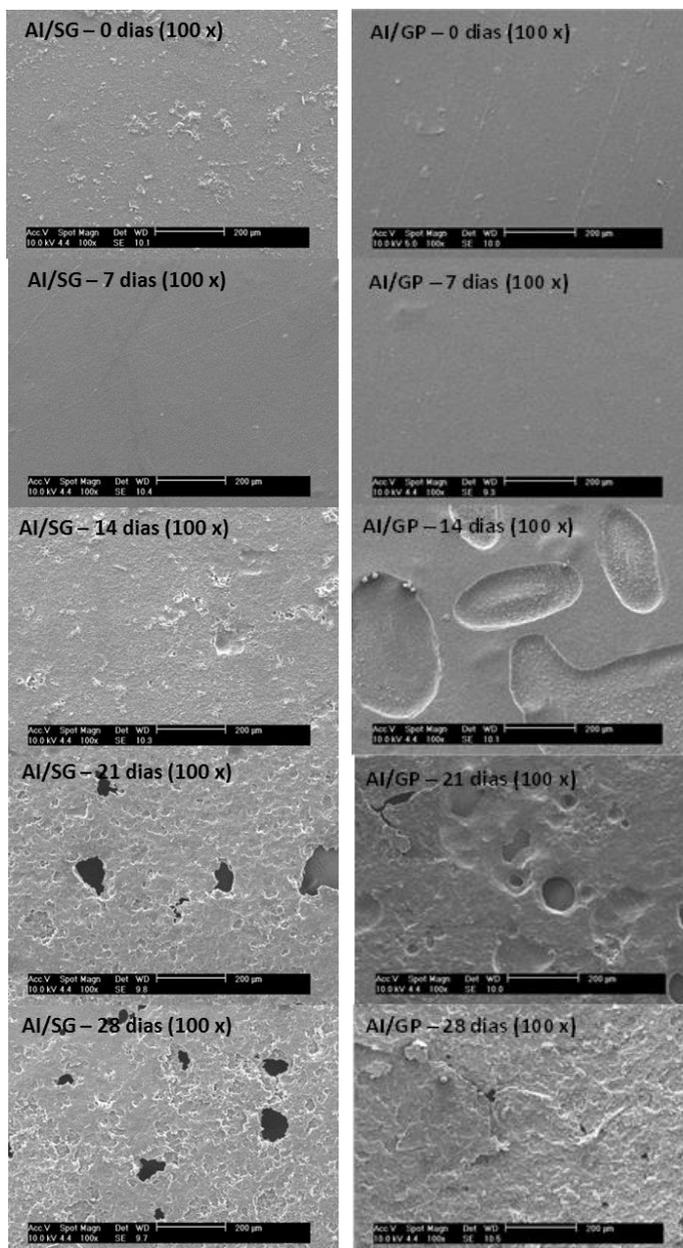


Figura 28. Micrografias de MEV (100x) das amostras Al/SG e Al/GP após 0, 7, 14, 21 e 28 dias de biodegradação em solo.

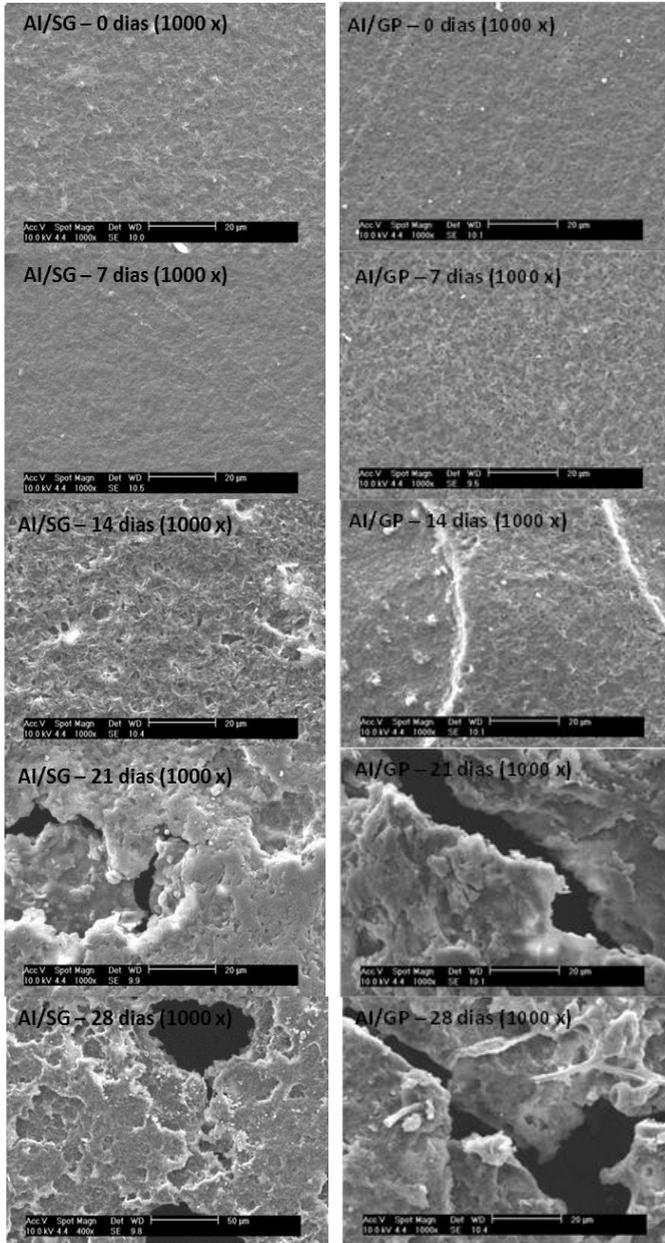


Figura 29. Micrografias de MEV (1000x) das amostras AI/SG e AI/GP após 0, 7, 14, 21 e 28 dias de biodegradação em solo.

4.5.3 Análise gravimétrica

A redução de massa das amostras é um parâmetro quantitativo largamente aplicado nos testes de degradação. Entretanto, uma série de problemas pode ocorrer, tais como a limpeza incorreta das amostras ou desintegração excessiva do material (SHAH *et al.*, 2008).

Para facilitar o acompanhamento da biodegradação em solo e promover a análise gravimétrica de forma mais correta, sem que se perdessem partes da amostra no interior do Becker, as amostras foram enterradas em uma embalagem de *nylon*. Ao serem desenterradas, as amostras apresentaram aparência conforme demonstrado na Figura 30.

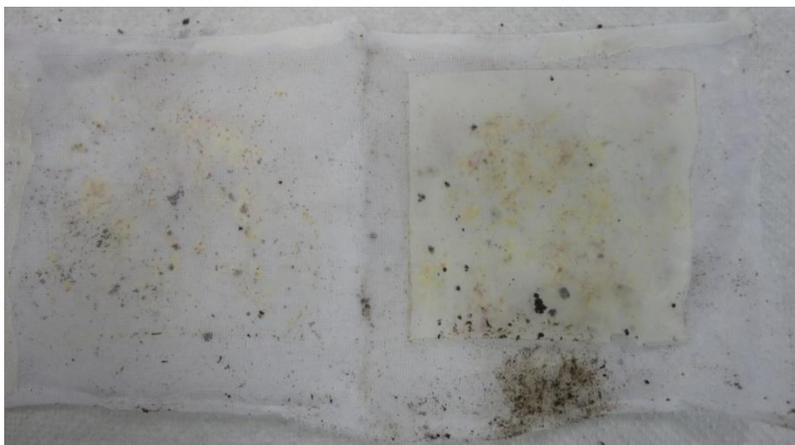


Figura 30. Foto da amostra de filme de P(3HB) utilizado para o teste de biodegradação em solo após ser desenterrada.

A inserção dessa embalagem de *nylon* retardou o início da degradação, porém, após o tempo em que os micro-organismos do solo necessitaram para ultrapassar a barreira física causada pela embalagem de *nylon*, ocorreu a biodegradação, como pode ser observado pelas análises subsequentes.

A determinação da redução de massa foi realizada por meio da mensuração da massa inicial das amostras e também após a biodegradação. Na Figura 31 está apresentada a cinética da redução de massa dos filmes AI/GP e AI/SG em valor percentual. Nos primeiros 7 dias de ensaio não houve degradação da amostra, como pode ser confirmando pelas análises visuais e de MEV. Após esse período, ambas

as amostras passam a perder drasticamente suas massas de forma muito semelhante, com curvas praticamente sobrepostas.

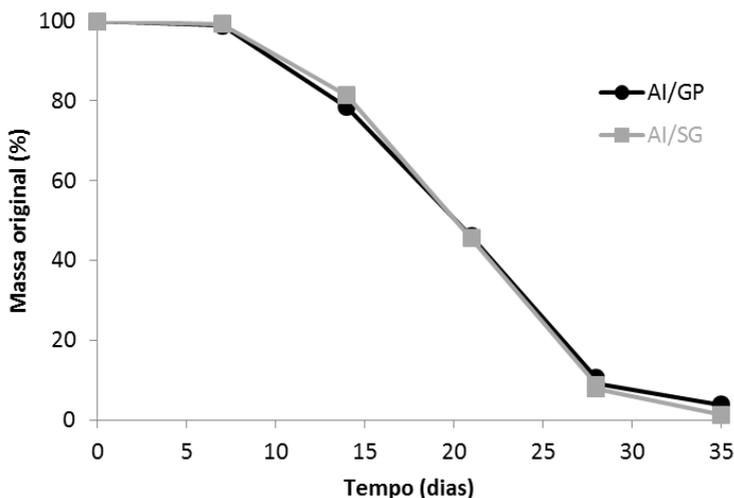


Figura 31. Gráfico da redução de massa em função do tempo de biodegradação em solo para as amostras AI/GP e AI/SG.

4.5.4 . Análise termogravimétrica (TGA)

As curvas de TGA (curvas TG e curvas DTG) para os polímeros AI/GP e AI/SG em função do tempo de biodegradação podem ser visualizadas na Figura 32 e os dados de temperatura de degradação (T_{onset}), temperatura máxima de degradação ($T_{\text{máx}}$) e percentual de perda de massa, determinados a partir destas curvas estão relacionados na Tabela 16.

Observou-se que ambos os polímeros apresentaram o mesmo perfil de degradação térmica em função do tempo de biodegradação em solo, com apenas um estágio de perda de massa, verificado pelas curvas DTG que apresentaram apenas um pico. Os filmes de P(3HB) após a degradação microbiana tornaram-se mais resistentes à degradação térmica, pois os T_{onset} 's das amostras degradadas foram superiores que o T_{onset} da amostra sem degradação. O aumento na estabilidade térmica é um resultado interessante, pois indica que as cisões das cadeias poliméricas provocadas pelo ataque microbiano não afetaram a

temperatura de degradação térmica dos polímeros. Oliveira *et al.* (2006) também observaram um aumento da $T_{máx}$ do P(3HB) após irradiação por radiação γ a 300 kGy. Por outro lado, este comportamento é diferente da tendência observada para outros polímeros. Para ambas as amostras o aumento de T_{onset} ocorreu até 21 dias de biodegradação em solo, seguido de uma mudança repentina da tendência deste parâmetro no 28º dia de ensaio.

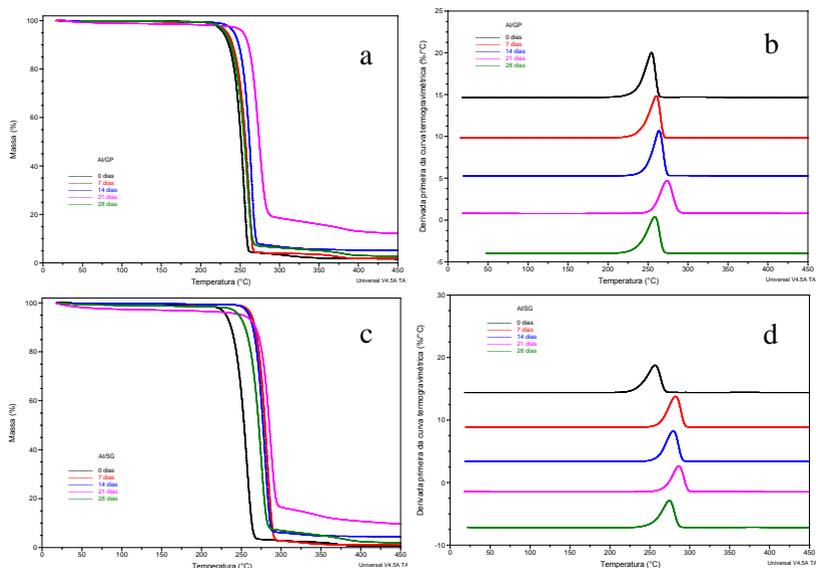


Figura 32. Curvas de TGA para os polímeros AI/GP e AI/SG em função do tempo de biodegradação: a) AI/GP termogravimetria (TG); b) AI/GP derivada primeira da curva termogravimétrica (DTG); c) AI/SG termogravimetria (TG); d) AI/SG derivada primeira da curva termogravimétrica (DTG).

Tabela 16. Temperatura de degradação (T_{onset}), temperatura máxima de degradação ($T_{\text{máx}}$) e percentual de perda de massa determinados por TGA para as amostras AI/GP e AI/SG em função do tempo de biodegradação.

Amostra (dias)	T_{onset} (°C)	% perda de massa	$T_{\text{máx}}$
AI/GP			
0	242,7	98,5	254,2
7	247,6	98,3	260,3
14	253,4	94,9	263,5
21	262,2	88,5	273,5
28	244,5	97,4	258,4
AI/SG			
0	242,8	99,4	256,3
7	270,0	98,9	281,9
14	267,4	95,6	279,0
21	274,4	91,5	286,0
28	261,0	98,2	274,2

4.5.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas de DSC (primeiro e segundo aquecimento) para os polímeros AI/GP e AI/SG em função do tempo de biodegradação estão apresentadas na Figura 33, e os dados de temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão cristalina (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade (α_c) determinados a partir dessas curvas estão relacionados na Tabela 17.

Observou-se para ambas as amostras um comportamento muito similar. Ambas as amostras apresentaram T_m constante e diminuição do grau de cristalinidade em função do tempo de biodegradação em solo. A amostra AI/GP apresentou um aumento da T_g em função do tempo de biodegradação, enquanto que para a amostra AI/SG, este parâmetro permaneceu constante.

Estes resultados discordam dos resultados relatados na literatura. Correa *et al.* (2008) observaram que para o ensaio de biodegradação de amostras injetadas de P(3HB) em solo simulado resultou em um aumento do grau de cristalinidade de 58 para 62,5 % após 3 meses de biodegradação. De acordo com Bonartseva *et al.* (2002) a degradação ocorre preferencialmente na fase amorfa, causando o aumento da cristalinidade.

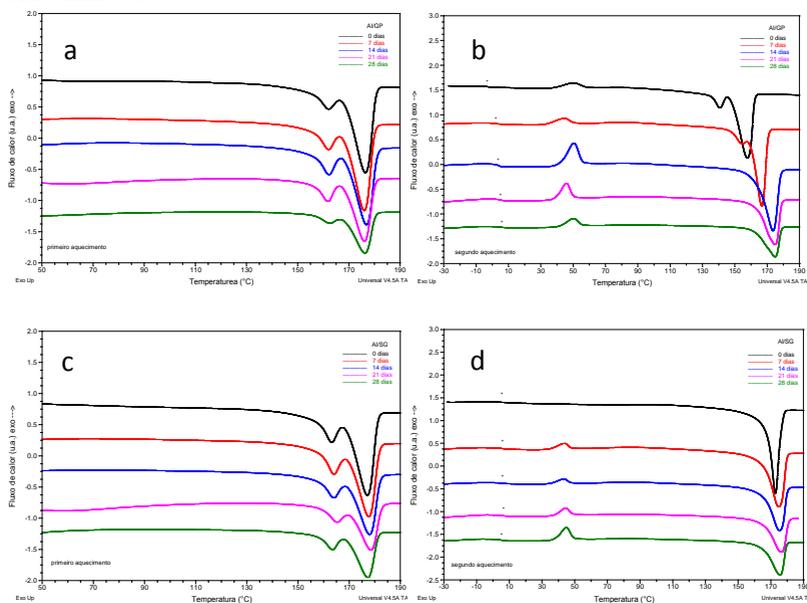


Figura 33. Curvas de DSC para os polímeros AI/GP e AI/SG em função do tempo de biodegradação: a) AI/GP primeiro aquecimento; b) AI/GP segundo aquecimento; c) AI/SG primeiro aquecimento; d) AI/SG segundo aquecimento.

Tabela 17. Dados de temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão cristalina (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade (α_c) determinados por DSC para as amostras AI/GP e AI/SG em função do tempo de biodegradação.

Amostra (dias)	T_g (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (J g⁻¹)	α_c (%)
AI/GP				
0	-3,3	161,2 e 176,4	88,7	60,8
7	2,3	161,9 e 175,9	84,7	58,0
14	3,7	162,1 e 176,8	81,3	55,7
21	5,0	161,7 e 176,1	63,0	43,2
28	5,7	162,0 e 176,3	40,4	27,7
AI/SG				
0	5,7	162,6 e 177,0	90,0	61,6
7	5,8	163,9 e 177,6	82,4	56,4
14	5,8	163,7 e 177,9	66,7	45,7
21	6,4	165,0 e 178,5	50,1	34,3
28	5,2	163,3 e 177,3	48,1	32,9

4.5.6 Difractometria de raios-X (DRX)

Na Figura 34 são apresentados os difratogramas de DRX dos polímeros AI/GP e AI/SG em função do tempo de biodegradação em solo e os dados de grau de cristalinidade determinados a partir dos difratogramas de DRX encontram-se na Tabela 18.

Comparando estes difratogramas, observou-se que o perfil de degradação foi diferente para as duas amostras. Considerando que ambas as amostras tinham o mesmo grau de cristalinidade (cerca de 61 %) esperava-se que o comportamento fosse similar. Para a amostra AI/GP não foi observado nenhuma formação de novos picos com o tempo de biodegradação, indicando que o ataque microbiano não causou o aparecimento de novas simetrias cristalinas, enquanto que para a

amostra AI/SG 2 novos picos de difração em 2θ iguais a 14 e 18,8, foram encontrados.

Para a amostra AI/GP foi observada uma diminuição da intensidade de todos os picos, o que levou a uma diminuição do grau de cristalinidade com o tempo de biodegradação após 21 dias em solo, passando de 60,7 para 44,6 %, concordando com os resultados obtidos por DSC. Por outro lado, para a amostra AI/SG, ocorreu uma diminuição do grau de cristalinidade após 14 dias, seguido de um aumento considerável desse parâmetro após 21 dias, resultado que não acompanha os resultados obtidos por DSC.

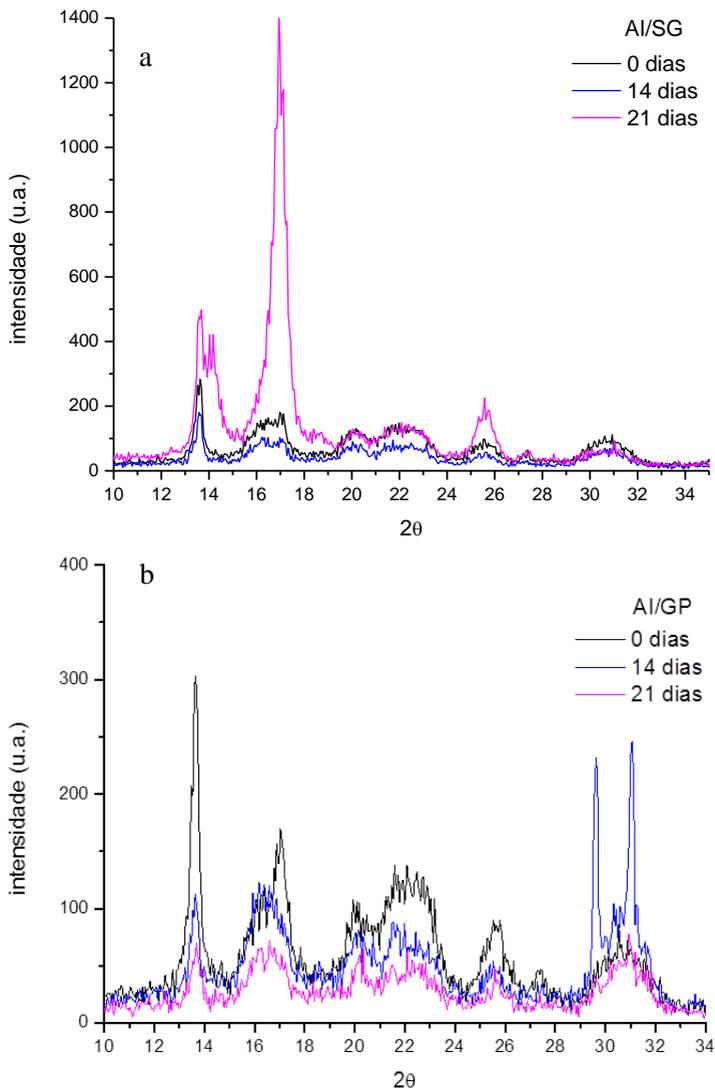


Figura 34. Difratogramas de DRX para os polímeros sintetizados em função do tempo de biodegradação: a) AI/GP b) AI/SG.

Tabela 18. Dados de grau de cristalinidade para os polímeros sintetizados com glicerol puro (AI/GP) e sem glicerol (AI/SG), determinados por difração de raios-X em função do tempo de biodegradação.

Amostra (dias)	α_c (%)
AI/GP	
0	60,7
14	60,9
21	44,3
AI/SG	
0	61,6
14	45,9
21	62,7

4.5.7 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 35 são apresentados os espectros de infravermelho com transformada de Fourier para os filmes obtidos nos ensaios AI/GP e AI/SG. Nos espectros de FTIR podem ser observadas várias alterações nos picos, como aparecimento de novos picos e diminuição de picos originalmente encontrados na amostra antes de ser submetida à biodegradação.

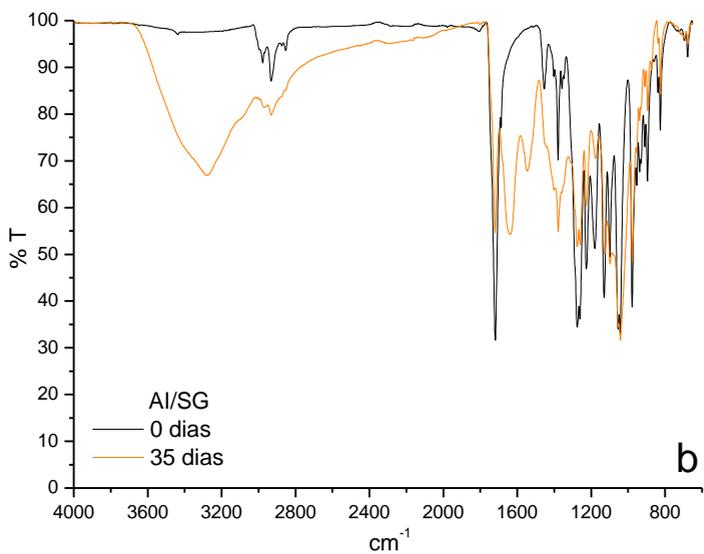
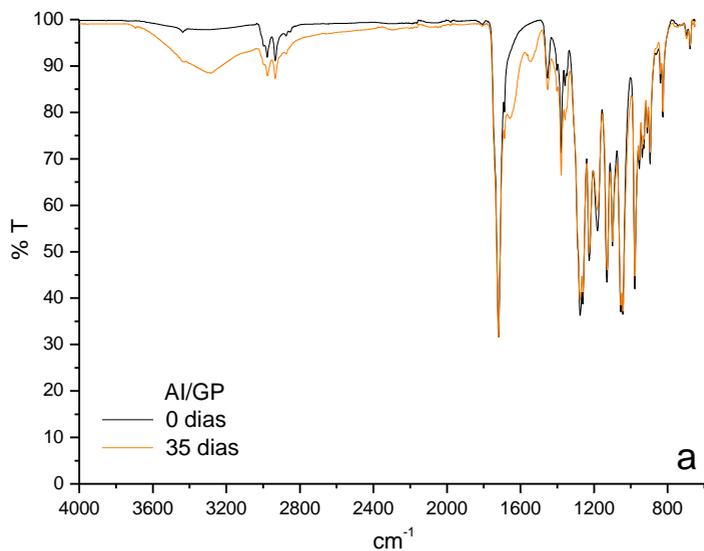


Figura 35. Espectro de FTIR das amostras antes e após 35 dias de degradação em solo. a) AI/GP e b) AI/SG.

No espectro do AI/SG (Figura 35b) observa-se que após 35 dias de biodegradação em solo houve uma diminuição acentuada na intensidade da banda de 1720 cm^{-1} (C=O), indicando que o ataque microbiano promoveu a clivagem das ligações do grupo éster. Ocorreu a diminuição da banda 979 cm^{-1} , indicando a cisão das ligações C-H do polímero. Observa-se também a diminuição da banda 1050 cm^{-1} , referente à ligação C-O. As reduções dessas mesmas bandas foram observadas por Rossa (2012) para degradação em solo simulado do PHBV. Embora não tenha sido feita uma avaliação quantitativa do índice de carbonila esses resultados sugerem que a degradação do P(3HB) foi devido à hidrólise das ligações ésteres.

Para as duas amostras degradadas foram observados o aparecimento de picos em 1655 e 1540 cm^{-1} . A banda que aparece em 1655 cm^{-1} pode ser atribuída à formação da ligação C=C. Esta modificação também foi observada por Shah *et al.* (2010) e Rossa (2012) em seus estudos de degradação do PHBV em solo. Segundo os autores, a formação da ligação C=C indica que houve a clivagem do PHBV pela depolimerase, comprovando a biodegradação da amostra.

4.6 Degradação em câmara de envelhecimento acelerado

A biodegradação e a degradação térmica de P(3HB) são amplamente estudadas, porém, segundo Sadi *et al.* (2010), a fotodegradação não é objeto de muitos estudos. Os estudos existentes na literatura são, na sua maioria, estudos de fotodegradação de copolímeros.

Na Figura 36, estão apresentadas as curvas de redução de massa em câmara de envelhecimento acelerado dos polímeros AI/GP e AI/SG, por um período de 91 dias.

Como pode ser observado, durante esse período houve perda na massa dos polímeros totalizando 2,4 e 3,7 % no final do ensaio. Essa perda foi bem inferior quando comparada com a perda de massa observada no ensaio de biodegradação em solo. Isso significa que esse polímero pode ser utilizado para diferentes aplicações sem que seja degradado antes de sua disposição em aterros sanitários ou industriais. Sendo assim, não foram realizadas as outras análises de caracterização para essas amostras. O efeito da radiação artificial UV-A nas propriedades do P(3HB) também foi estudado por Sadi *et al.*, 2010. Estes autores relataram diversas mudanças no polímero após 12 semanas de ensaio, tais como reações de cisão e de *crosslinking*, formação de grupo carbonila, aumento superficial da cristalinidade, aparecimento de

trincas e esbranquiçamento da superfície da amostra. A biodegradabilidade das amostras expostas a longos períodos de exposição à radiação UV levou a um atraso no início da degradação, explicado pela alta cristalinidade superficial da amostra.

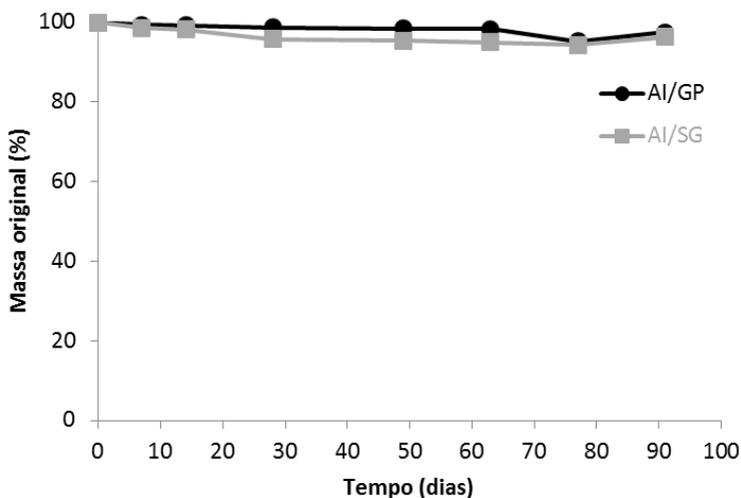


Figura 36. Gráfico da redução de massa em função do tempo de envelhecimento acelerado para as amostras AI/GP e AI/SG.

A sensibilidade de polímeros à fotodegradação está relacionada com a capacidade de absorver a parte prejudicial da radiação solar troposférica. Isto inclui a radiação UV-B terrestre (~ 295-315 nm) e UV-A (~315-400 nm) responsável pela fotodegradação direta (fotólise, fotooxidação iniciada). A parte visível da luz solar (400-760 nm) acelera a degradação polimérica por aquecimento, enquanto a radiação infravermelha (760-2500 nm), acelera a oxidação térmica (SHAH *et al.*, 2008).

CONCLUSÕES

Pode-se considerar que o uso do glicerol bruto como cosubstrato é viável pois proporcionou resultados semelhantes ao controle. Nos ensaios preliminares em frascos agitados foi possível verificar que o glicerol, nas concentrações testadas, não foi um inibidor do cultivo tanto na forma purificada quanto forma bruta.

A avaliação dos ensaios delineados mostrou que a temperatura de cultivo e a concentração de açúcar invertido foram as variáveis que exerceram influência significativa para a produção e o acúmulo percentual do P(3HB). Os melhores resultados foram obtidos a 38 °C e com 30 g L⁻¹ de açúcar invertido. Porém, mesmo não sendo estatisticamente significativo para a concentração de glicerol, não haviam sido realizadas até esta etapa, análises de caracterização do polímero para saber se este componente como cosubstrato traria alguma contribuição na melhoria de suas propriedades. A adição de 15 g L⁻¹ de glicerol aumentou o percentual de acúmulo de P(3HB) em 15 %.

Após comparação entre os valores preditos pelo modelo e os obtidos experimentalmente, foi possível validar o modelo para o acúmulo percentual de P(3HB) para todas as condições avaliadas e para a produção de P(3HB) nas duas condições em que havia 30 g L⁻¹ de açúcar invertido com e sem glicerol. O experimento que levou à maior produtividade global em polímero (0,32 g L⁻¹ h⁻¹) foi o realizado com 30 g L⁻¹ de açúcar invertido e 15 g L⁻¹ de glicerol.

Em biorreator, os parâmetros cinéticos de produtividade e de rendimento em célula e polímero foram todos muito semelhantes para o cultivo com ou sem adição de glicerol purificado. Não foi possível determinar esses parâmetros para os ensaios com gliceróis brutos, pois o crescimento celular e a produção de P(3HB) foram muito baixos (P(3HB) < 0,5 g L⁻¹). Sendo assim, o uso do glicerol sem purificação para remoção das impurezas não é recomendado para a produção de P(3HB).

A caracterização mostrou que os polímeros sintetizados em biorreator apresentam propriedades muito similares aos P(3HB) obtidos por outros autores e também que a presença de glicerol puro no meio não modificou as propriedades. Nas condições avaliadas neste trabalho o glicerol não mostrou ter contribuído significativamente na produção ou nas propriedades térmicas ou mecânicas do P(3HB).

As amostras dos filmes de P(3HB) dos ensaios AI/GP e AI/SG degradaram em solo num período de 35 dias, podendo afirmar que os polímeros sintetizados são biodegradáveis.

Esses polímeros mantiveram-se estáveis quando expostos a câmara de envelhecimento acelerado durante 91 dias o que permite que o P(3HB) sintetizado seja utilizado em diversas aplicações, pois não se degradará antes de ser descartado.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, G.A. **Obtenção e caracterização físico-química do biodiesel de canola (*Brassica napus*)**. João Pessoa. Dissertação de Mestrado (Química), Universidade Federal da Paraíba, 2006.

AMON, T., KRYVORUCHKO, V., AMON, B., SCHREINER, M. Untersuchungen zur Wirkung Von Rohglycerin aus der Biodieselerzeugung als leistungssteigerndes Zusatzmittel zur Biogaserzeugung aus Silomais, Körnermais, Rapspresskuchen und Schweinegülle, **Relatório final, SEEG**, Mureck, Austria, 2004.

AMORIN, V.P.P.; NASCIMENTO, T.A.; PERES, S.; PALHA, M.L.A.P.F. Purificação da glicerina bruta oriunda do biodiesel e seu uso na produção de biogás. *In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos*, 2011, Caxias do Sul. Anais... Caxias do Sul, 2011.

ANDERSON A.J.; DAWES, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiological Reviews**. v.54, p. 450-472, 1990.

ARAGÃO, G. M. F.; LINDLEY, N. D.; URIBELARREA, J. L.; PAREILLEUX, A. Maintaining a controlled residual growth capacity increases the production of polyhydroxyalkanoate copolymers by *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology Letters**. v.18, p.937-942, 1996.

ARRUDA, P.V.; RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analítica**. n.26, p.56-62 2006.

ASTM D-618, Standard Practice for Conditioning Plastics for Testing, 2008.

ASTM D882-09, Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, 2009.

ASTM G160-98, Standard Practice for Evaluating Microbial Susceptibility of Nonmetallic Materials by Laboratory Soil Burial, 1998.

AYUB, M.A.Z. Glicerol residual do biodiesel como plataforma para bioprocesso. *In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos*, 2011, Caxias do Sul. Anais... Caxias do Sul, 2011.

BIODIESELBR. Disponível em:
<<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/biodiesel.htm>>. Acesso em: 10 abr 2011.

BONARTSEVA, G.A.; MYSHKINA, V.L.; NILOLAEVA, D.A.; REBROV, A.V.; GERASIN, V.A.; MAKHINA, T.K. The biodegradation of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by a model soil community: the effect of cultivation conditions on the degradation rate and the physicochemical characteristics of PHB. **Microbiology**. v.71, p. 221, 2002.

BORMANN, E.J.; ROTH, M. The production of polyhydroxybutyrate by *Methylobacterium rhodesianum* and *Ralstonia eutropha* in media containing glycerol and casein hydrolysates. **Biotechnology letters**. v.21, 1059-1063, 1999.

BRANCO, L.S.C.; CAETANO, T.M.; ALMENIDA, M.M.T.; SOUSA, K.A.; AZEVEDO, D.C.S.; PINTO, G.A.S. Produção de carotenóides por linhagens do gênero *Rhodotorula*: O uso do glicerol com fonte de carbono. In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul. Anais... Caxias do Sul, 2011.

BRANDL, H.; GROSS, R.A.; LENZ, R.W.; FULLER, R.C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied and Environmental Microbiology**. v.54, p.1977-1982, 1988.

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K.F. Review article: Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**. v.65, p.127-61, 1998.

BYROM, D. Polymer synthesis by micro-organisms: technology and economics. **Tibtech**. v.5, p. 246-250. 1987.

BYROM, D. Production of poly- β -hydroxybutyrate: poly- β -hydroxybutyrate copolymers. **FEMS Microbial Reviews**, v.103, p.247-250, 1992.

CANEVAROLO, S.V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. São Paulo: Artliber, 2003.

CASTILHO, R.L.; MITCHELL, D.A.; FREIRE, D.M.G. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. **Bioresource Technology**. v.100, p.5996- 6009, 2009.

CAVALHEIRO, J.M.B.T.; ALMEIDA, M.C.M.D.; GRANDFILS, C.; FONSECA, M.M.R. Poly(3-hydroxybutyrate) production by

Cupriavidus necator using waste glycerol. **Process Biochemistry**. 44, p.509–515, 2009.

CAVALHEIRO, J.M.B.T.; RAPOSO, R.S.; ALMEIDA, M.C.M.D.; GRANDFILS, C.; FONSECA, M.M.R. Effect of cultivation parameters on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. **Bioresource Technology**. v.111, p. 391–397, 2012.

CHEN, G. Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. **Chemical Society Reviews**. v.38,p. 2434–2446, 2009.

CONTI, D.S. **Estudo de miscibilidade, morfologia e propriedades mecânicas de blendas de P(3HB)/P(3HB-co-3HV) e equilíbrio de fases em alta pressão de P(3HB)/P(3HB-co-3HV) em gases densos**. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia dos Materiais) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, 2006.

CORRÊA, M.C.S.; REZENDE, M.L.; ROSA, D.S.; AGNELLI, J.A.M.; NASCENTE, P.A.P. Surface composition and morphology of poly(3-hydroxybutyrate) exposed to biodegradation. **Polymer Testing**. v.27, p.447-452, 2008.

DALCANTON, F. Produção, extração e caracterização de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* em diferente substratos. Florianópolis. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

DIXON'S Q-TEST: DETECTION OF A SINGLE OUTLIER. Departamento de Química da Universidade de Atenas. Disponível em: <http://www.chem.uoa.gr/applets/AppletQtest/Text_Qtest2.htm> Acesso em: fev. de 2012.

DOBROTH, Z.T.; HU, S.; COATS, E.R.; MCDONALD, A.G. Polyhydroxybutyrate synthesis on biodiesel wastewater using mixed microbial consortia. **Bioresource Technology**. v.102, p.3352-3359, 2011.

DOI, Y.; SEGAWA, A.; KUNIOKA, M. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 12, p.106-111, 1990.

DUARTE, M.A.T. **Estudo do processamento e da degradação térmica do poli(3-hidroxibutirato) e de suas blendas com poli(ϵ -caprolactona)**. Dissertação de Mestrado (Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade do Estado de Santa Catarina, Joinville, 2004.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. da S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, v. 28, p. 19-23, 2005.

FERREIRA, T.F.; COELHO, M.A.Z.; RIBEIRO, C.M.S. Avaliação da capacidade produtora de 1,3-PDO a partir de glicerina bruta por duas cepas: *C. freundii* e *L. brevis* In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul. Anais... Caxias do Sul, 2011.

FORMOLO, M.C.; CAPANEMA, D.; GRIGULL, V.H.; APATI, G.P., FURLAN, S.A.; SCHNEIDER, A.L.S.; ARAGÃO, G.M.F; PEZZIN, A.P.T. New strategy for extraction of poly(3-hydroxybutyrate) synthesized by *Ralstonia eutropha*, In: VIII Congresso Brasileiro de Polímeros (CBPOL), Águas de Lindóia. Anais... Águas de Lindóia, 2005.

GARCIA, M.C.F. **Proposta de um processo de extração de poli(3-hidroxibutirato) produzido por *Cupriavidus necator* e seu efeito sobre as características do polímero**. Florianópolis. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

GOMES, J.G.C.; BUENO NETTO, C.L. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, v.17, p.24-29, 1997.

GRIGULL, V.H.; SILVA, D.D.; GARCIA, M.C.F.; FURLAN, S.A.; PEZZIN, A.P.T.; SCHNEIDER, A.L.S. ; ARAGAO, G.M.F. Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate) from oleic acid by *Ralstonia eutropha*. **Food Technology and Biotechnology**. v.46, p.223-228, 2008.

GUMEL, A.M; ANNUA, M.S.M; HEIDELBERG, T. Effects of carbon substrates on biodegradable polymer composition and stability produced by *Delftia tsuruhatensis* Bet002 isolated from palm oil mill effluent. **Polymer Degradation and Stability**. v.97, p.1224-1231, 2012.

HAZIMAH, A.H.; OOI, T.L.; SALMIAH, A. Recovery of glycerol and diglycerol from glycerol pitch. **Journal of Oil Palm Research**. v.15, p.1-5, 2003.

HGCA - HOME-GROWN CEREALS AUTHORITY – (2006). **Impact of Biodiesel Production on the Glycerol Market**. Disponível em <http://hgca.com/document.aspx?fn=loademedia_publicationId=2363> . Acesso em 25 out 2010.

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

IKADA, E. Electron microscope observation of biodegradation of polymers. **Journal of Environmental Polymer Degradation**. v.7, p. 197–201, 1999.

JENDROSSEK, D.; SCHIRMER, A.; SCHLEGEL, H.G. Biodegradation of polyhydroxyaldanoic acids. Mini-review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.46, p.451-456, 1996.

JUSTI, T. Vida curta para o plástico. **IPESI-Química e Petróleo**, p.28-29, abril-maio, , 1991.

KUNIOKA, M.; TAMAKI, A.; DOI, Y. Crystalline and thermal properties of bacterial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). **Macromolecules**. v.22, p.694-697, 1989.

LAGES, F.; SILVA-GRAÇA, M.; LUCAS, C. Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. **Microbiology**, v.45, p.2577 -2585, 1999.

LEE, S.Y. Plastic bacteri: progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Trends Biotechnology**, v.14, p.437-438, 1996a.

LEE, S.Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Review: **Biotechnology and Bioengineering**, v.49, p.1-14, 1996b.

LIMA, J.A. **Blendas de poli(hidroxibutirato) e elastômeros de epiclorigrina**. Campinas. Dissertação (Mestrado em Físico-Química), Universidade Estadual de Campinas, 2004.

LUCAS, N.; BIENAIME, C.; BELLOY, C.; QUENEUEDEC, M.; SILVESTRE, F.; NAVA-SAUCEDO, J.E. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review. **Chemosphere**, v.73, p. 429-442, 2008.

MAHISHI, L.H.; TRIPATHI, G.; RAWAL, S.K. Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* harbouring *Streptomyces aureofaciens* PHB biosynthesis genes: effect of various carbon and nitrogen sources. **Microbiological Research**, v.158, p.19-27, 2003.

MARANGONI, C.; FURIGO Jr., A.; ARAGÃO, G.M.F. Oleic acid improves poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in inverted sugar and propionic acid. **Biotechnology Letters**, v.22, p.1635-1638, 2000.

MARANGONI, C. **Estudo de estratégias de produção de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por *Ralstonia eutropha* utilizando substrato de baixo custo e ácido propiônico**. Florianópolis. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

MAZUR, L. P.; SILVA, D.D.; GRIGULL, V.H.; GARCIA, M.C.F.; MAGALHÃES, T.O.; WAGNER, T.M.; EINLOFT, S.; DULLIUS, J.; SCHNEIDER, A.L.S.; PEZZIN, A.P.T. Strategies of biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) supplemented with biodiesel obtained from rice bran oil. **Materials Science e Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems**, v.9, p.583-587, 2009.

MEDEIROS, I.L.; MARACACINI, J.M.S.A.; DUARTE, M.A.T.; PEZZIN, S.H.; SOBRAL, J.C.; BALZER, P.S.; BERNARDO, H.P.; EVERLING, M.T.; PEZZIN, A.P.T. Inovação em materiais: estudo para desenvolvimento de escova dental a partir de polímeros biodegradáveis. **Revista Matéria**, v. 10, p. 1-7, 2005.

MERGAERT, J.; WEBB, A.; ANDERSON, C.; WOUTERS, A.; SWINGS, J. Microbial degradation of poly (3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soil. **Applied Environmental Microbiology**. v.59, p. 3233-3238, 1993.

MEINICKE, R.M.; MULLER, B.L; MORITZ, D.E.; NINOW, J.L. Parâmetros cinéticos da influência da fonte de nitrogênio de produção de pigmentos vermelhos por *Monascus ruber*, utilizando glicerol como substrato. In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul. Anais... Caxias do Sul, 2011.

MOTHES, G.; SCHNORPFEIL, C.; ACKERMANN, J.-U. Production of PHB from crude glycerol. **Engineering in Life Sciences**, v.7, p.475-479, 2007.

MOUSAVIOUN, P.; GEORGE G.A.; DOHERTY, W.O.S. Environmental degradation of lignin/poly(hydroxybutyrate) blends. **Polymer Degradation and Stability**, 97 (2012) 1114-1122.

NASCIMENTO, J.F. **Estudo da processabilidade e da caracterização do poli(3-ácido butírico) – PHB obtido a partir da cana-de-açúcar**. Campinas. Dissertação de Mestrado (Faculdade de Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, 2001.

NASCIMENTO, I.C.S.; LIMA, C.M.; COUTO, M.A.P.G. Cultivo de leveduras *Rhodotorula minuta* e *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) para produção de carotenóides utilizando como fonte de carbono o glicerol proveniente da produção de biodiesel. In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul. Anais... Caxias do Sul, 2011.

NICKEL, P.I.; PETTINARI, M.J.; GALVAGNO, M.A.; MÉNDEZ, B.S. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from glycerol by a recombinant *Escherichia coli arcA* mutant in fed-batch microaerobic cultures. **Applied Microbial and Cell Physiology**. v.77, p.1337-1343, 2008.

NONATO, R.V.; MANTELATTO, P.E.; ROSSEL, C.E.V. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. Mini-Review. **Applied Microbiology Biotechnology**. v.57, p.1-5, 2001.

OJUMO, T.V.; YU, J.; SOLOMON, B.O. Production of polyhydroxyalcanoates, a bacterial biodegradable polymer. **African Journal of Biotechnology**, v.3, p.18-24, 2003.

OLIVEIRA, L.M.; ARAÚJO, E.S.; GUEDES, S.M.L. Gamma irradiation effects on poly(hydroxybutyrate). **Polymer Degradation and Stability**. 91: 2157–2162, 2006.

OLIVEIRA, N. de. **Governo estuda aumentar percentual de biodiesel no óleo diesel mineral em 2012**. EBC – Empresa Brasil de Comunicações. Disponível em <http://agenciabrasil.ebc.com.br/noticia/2011-02-15/governo-estuda-aumentar-percentual-de-biodiesel-no-oleo-diesel-mineral-em-2012>. Acessado em: 28 de agosto de 2012.

OOI, T. L.; YONG, K. C.; HAZIMAH, A. H.; DZULKEFLY, K.; WAN-YUNUS, W. M. Z. Glycerol residue - a rich source of glycerol and medium chain fatty acids. **Journal of Oleo Science**. v.53, p. 29-33, 2004.

PARRA D.F.; FUSARO, J.; GABOARDI F.; ROSA, D.S. Influence of poly (ethylene glycol) on the thermal, mechanical, morphological, physical-chemical and biodegradation properties of poly(3-hydroxybutyrate). **Polymer Degradation and Stability**. v.91, p.1954-1959, 2006.

PICCOLI, R.A.M; SILVA, E.S.; TACIRO, M.K.; MAIORANO, A.E.; RIBEIRO, C.M.S.R.; RODRIGUES, M.F.A. Produção de polihidroxibutirato a partir de glicerol resíduo da produção de biodiesel. *In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul. Anais... Caxias do Sul, 2011.*

POSADA, J.A.; NARANJO, J.M.; LÓPEZ, J.A.; HIGUITA, J.C.; CARDONA, C.A. Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. **Process Biochemistry**. v.46, p.310-317, 2010.

POSADA, J.A.; RINCÓN, L.E.; CARDONA, C.A. Design and analysis of biorefineries based on raw glycerol: Addressing the glycerol problem. **Bioresource Technology**. v. 111, p. 282-293, 2012.

REE, Y.H.; YUN, K.Y.; BAE, K.S. Accumulation of copolyesters consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes sp* SH . 69 in batch culture. **Biotechnology Letters**. v.14, p.27-32, 1992.

REICH, L; STIVA, S.S. **Elements of Polymer Degradation**, New York: McGraw-Hill Book Company, p.361, 1971.

RINALDI, R.; GARCIA, C.; MARCINIUK, L.L.; ROSSI, A.V.; SCHUCHARDT, U. Síntese de biodiesel: uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. **Química Nova**. 30, p. 44-51, 2007.

RIVALDI, J.D.; SARROUH, B.F.; FIORILO, R.; SILVA, S.S. Glicerol de biodiesel. **Biotecnologia**. v.37, p.44-45, 2008.

RIVALDI, J.D.; DUARTE, L.C.Q.; FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M. Cinética de crescimento de espécies de *Lactobacillus* em meio a base de glicerol. *In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul. Anais... Caxias do Sul, 2011.*

ROSSA, L.V. **Avaliação das propriedades de compósitos de poli(hidroxibutirato-co-valerato) reforçado com fibras de curauá**. Caxias do Sul. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Processos e Tecnologias), Universidade de Caxias do Sul, 2012.

ROSSI D. M.; SOUZA E. A.; AYUB M. A. Z. Produção de etanol utilizando glicerol residual como fonte de carbono. *In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul. Anais... Caxias do Sul, 2011.*

SADI, R.K.; FECHINE, G.J.M.; DEMARQUETTE, N.R. Photodegradation of poly(3-hydroxybutyrate). **Polymer Degradation and Stability.** v. 95, p. 2318-2327, 2010.

SANTOS, J.V.S.; ROBRA, S.; CRUZ, R.S.; OLIVEIRA, A.M. Avaliação da produção de biogás utilizando a glicerina residual resultante da produção de biodiesel. *In: XLVI Congresso Brasileiro de Química, 2006, Salvador. Anais... Salvador, 2006.*

SANTOS, E.O.; MICHELON, M.; GALLAS, J.A.; KALIL, J.; BURKERT. C.A.V. Glicerol como substrato para produção de biomassa de levedura. *In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul. Anais... Caxias do Sul, 2011a.*

SANTOS, J. R.; OLIVEIRA, C. G.; SIQUEIRA, A. K. P. B.; SILVA, G. F.; FERREIRA, A. L. O. Utilização de glicerol com fonte de carbono para obtenção de carotenóides de *Rhodotorula glutinis*. *In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul. Anais... Caxias do Sul, 2011b.*

SANTOS, D. P.; PINTO, J. C. C. S.; ALVES, T. L. M. Produção de Poli(hidroxialcanoatos) a partir de Glicerol. *In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul. Anais... Caxias do Sul, 2011c.*

SCHNEIDER, A.L.S. **Síntese, caracterização e biodegradação de poli-3-hidroxibutirato - P(3HB) de *Ralstonia eutropha* e blendas de P(3HB)/PCL (poli- ϵ -caprolactona).** Florianópolis. Tese de Doutorado (Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

SCHNEIDER, A.L.S.; SILVA, D.D.; GARCIA, M.C.F.; GRIGULL, V.H.; MAZUR, L.P.; FURLAN, S.A.; ARAGÃO, G.F.; PEZZIN, A.P.T. Biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate) produced from *Cupriavidus necator* with different concentrations of oleic acid as nutritional supplement. **Journal of Polymers and the Environment,** v.18, p.401-406, 2010.

SHAH, A.A.; HASAN, F.; HAMEED, A.; AHMED, S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. **Biotechnology Advances.** v. 26, p. 246–265, 2008.

SHAH, A.A.; HASAN, F.; HAMEED, A. Degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by a newly isolated *Actinomadura* sp. AF-555, from soil. **International Biodeterioration e Biodegradation**, n.64, p. 281-285, 2010.

SILVA, G.P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**. v.27, p.30-39, 2009.

SILVA, A.M.; HENRIQUES, M.L.O.M.F.; ALBUQUERQUE, C.D.C.; TAKAKI, G.M.C. Efeitos e interações da milhocina, glicerina e ureia sob a produção de quitosana. *In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos*, 2011, Caxias do Sul. Anais... Caxias do Sul, 2011a.

SILVA, S.B.; SCHMAEDECKE, C.M.; AYUB, M.A.Z. Uso de glicerol residual de biodiesel e de soro de leite como substratos alternativos para a produção de ácido gama-poliglutâmico. *In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos*, 2011, Caxias do Sul. Anais... Caxias do Sul, 2011b.

SILVA, G. F.; PINHEIRO, R. S.; ROCHA, M. B.; FERREIRA, A. L. O. Produção de etanol por *Klebsiella pneumoniae* utilizando glicerol bruto como substrato. *In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos*, 2011, Caxias do Sul. Anais... Caxias do Sul, 2011c.

SOUSA, K.A.; JÚNIOR, G.S.F.; SOUZA, C.G.; SOUSA, D.M.; AMORIN, M.V.F.S.; PINTO, G.A. S.; AZEVEDO, D.C.S. Avaliação do uso do glicerol em processo de produção de celulasas por *Trichoderma* INPA 1218. *In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos*, 2011, Caxias do Sul. Anais... Caxias do Sul, 2011.

SQUIO, C.R. **Estratégias de alimentação e utilização de suplementos nutricionais na produção de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxi-valerato) por *Ralstonia eutropha***. Florianópolis. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

SUAVE, J.; DALLAGNOL, E.C.; PEZZIN, A.P.T.; MEIER, M.M.; SILVA, D.A.K. Biodegradable microspheres of poly(3-hydroxybutyrate/poly(ϵ -caprolactone) loaded with malathion pesticide: preparation, characterization and *in vitro* controlled release test. **Journal of Applied Polymer Science**, v.117, p.3419-3427, 2010.

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

TABUCHI, S.C.T.; CHAGAS, M.H.R.; VIEIRA, T.A.; PRATA, A.M.R. Avaliação da fonte de nitrogênio para o cultivo de *Bacillus thuringiensis var. israelensis* visando a produção de bioinseticida a partir de glicerol. In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul. Anais... Caxias do Sul, 2011.

THOMPSON, J.C.; HE, B.B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**. v.22, p.261-265, 2006.

VIGNESWARI, S.; VIJAYA, S.; MAJID, M.; SUDESH, K.; SIPAUT, C.; AZIZAN, M.; AMIRUL, A. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) co-polymer with manipulated variables and its properties. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 36, p. 547–556, 2009.

VOGELSANGER, N.; FORMOLO, M.C.; PEZZIN, A.P.T.; SCHNEIDER, A.L.S.; FURLAN, S.A.; BERNARDO, H.P.; PEZZIN, S.H.; PIRES, A.T.N.; DUEK, E.A.R. Blendas biodegradáveis de poli(3-hidroxibutirato)/poli(ϵ -caprolactona): obtenção e estudo da miscibilidade, **Materials Research**, v.6, p.359-365, 2002.

WANG, Y.W.; MO, W.; YAO, H.; WU, Q.; CHEN, J.; CHEN, G.Q. Biodegradation studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Polymer Degradation and Stability**. v.85, p. 815-821, 2004.

WANG, Z-X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B.A. Glycerol production by microbial fermentation: A review. **Biotechnology Advances**, v. 19 , p.201, 2001.

WESSLER, K. **Sistemas de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) com PCL-T: comportamento de fase, reologia, propriedades mecânicas e processabilidade**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Estadual de Santa Catarina – UFSC, Joinville, 2007.

WILLIAMS, S.F.; MARTIN, D.P.; HOROWITZ, D.M; PEOPLES, O.P. PHA applications: addressing the price performance issue I. Tissue Engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.25, p. 111-121, 1999.

XU, J.; GUO, B. H.; YANG, R.; WU, Q.; CHEN, G. Q.; ZHANG, Z. M. *In situ* FTIR study on melting and crystallization of polyhydroxyalkanoates. **Polymer**. v.43, p. 6893 – 6899, 2002.

YANG, X.J.; KOW, L.M.; FUNABASHI, T.; MOBBS, C.V.; Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. **Diabetes**. v.48, p.1763, 1999.

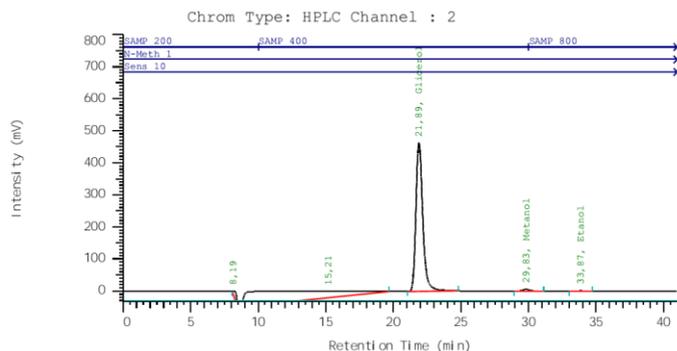
Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Culture. Disponível em <www.dsmz.de> Acesso em set/2010.

Anexo 1 – Cromatogramas dos gliceróis provenientes dos biodieséis

D-7000 HSM: Validation Series: 5161 Report: modified System: UNIVILLE

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 07/11/12 17:01 Reported: 05/12/12 18:38
 Processed: 05/12/12 18:38
 Data Path: C:\Win32App\HSM\validate\DATA\5161\
 Processing Method: Acido latico ion300
 System(acquisition): UNIVILLE Series:5161
 Application: Validation Vial Number: 1
 Sample Name: Amostra Glicerol Vial Type: UNK
 Injection from this vial: 1 of 1 Volume: 20,0 ul
 Sample Description:



Acquisition Method: Acido latico ion300
 Column Type: RP18 Developed by: Theodoro
 Pump A Type: L-7100
 Solvent A: H2SO4 8,5mM Solvent B: H2O
 Solvent C: Metanol Solvent D: ACN
 Method Description: Método para determinação de ácido láctico. Usando coluna Transgenomic ice-ion 300. Curvas de calibração série 4663 do glicerol, também na série 4731 e 5003 (Lactose PA).

Chrom Type: HPLC Channel : 2

Peak Quantitation: AREA
 Calculation Method: EXT-STD

No.	RT	Name	Area	Conc 1 g/L	BC
1	8,19		425977	0,000000	BB
2	15,21		15697684	0,000000	BB
3	21,89	Glicerol	16195204	7,66033	BB
4	29,83	Metanol	297902	0,000000	BB
5	33,87	Etanol	76812	0,0679561	BB
			32693579	7,72829	

Peak rejection level: 5000

Figura 37. Cromatograma do glicerol proveniente da extração de biodiesel de rota metílica, sintetizado na UNIVILLE.

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 30/05/12 14:45

Reported: 30/05/12 16:51

Processed: 30/05/12 16:51

Data Path: C:\Win32App\HSM\validate\DATA\5147\

Processing Method: Acido latico ion300

System (acquisition): UNIVILLE

Series: 5147

Application: Validation

Vial Number: 6

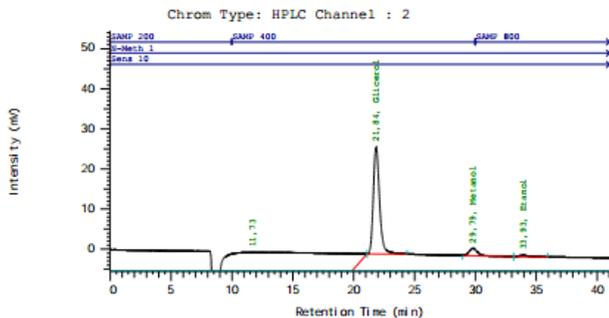
Sample Name: 2

Vial Type: UNK

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 20,0 ul

Sample Description:



Acquisition Method: Acido latico ion300

Column Type: RP18

Developed by: Theodoro

Pump A Type: L-7100

Solvent A: HAc 1%

Solvent B: H2SO4 8,5mM

Solvent C: Metanol

Solvent D: ACN

Method Description: Método para determinação de ácido láctico. Usando coluna Transgenomic ice-ion 300. Curvas de calibração série 4663 do glicerol, também na série 4731 e 5003 (Lactose PA).

Chrom Type: HPLC Channel : 2

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

No.	RT	Name	Area	Conc 1 g/L	BC
1	11,73		16088857	0,000000	BB
2	21,84	Glicerol	941738	0,445442	BB
3	29,79	Metanol	90265	0,000000	BB
4	33,93	Etanol	23060	0,0204012	BB
			17143920	0,465843	

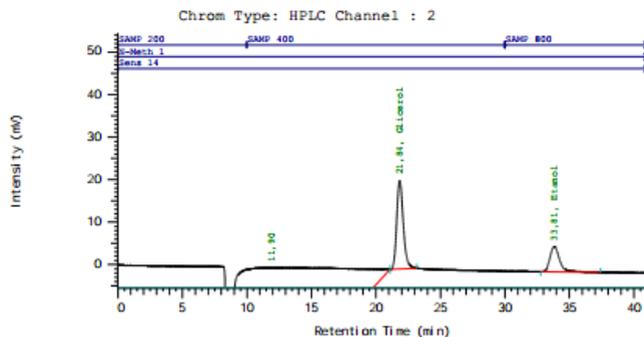
Peak rejection level: 5000

Figura 38. Cromatograma do glicerol proveniente da extração de biodiesel de rota metílica, sintetizado na PUCRS.

D-7000 HSM: Validation Series: 5147 Report: modified System: UNIVILLE

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 30/05/12 15:27 Reported: 30/05/12 16:53
 Data Path: C:\Win32App\HSM\validate\DATA\5147\
 Processed: 30/05/12 16:52
 Processing Method: Acido latico ion300
 System(acquisition): UNIVILLE Series:5147
 Application: Validation Vial Number: 7
 Sample Name: 1 Vial Type: UNK
 Injection from this vial: 1 of 1 Volume: 20,0 ul
 Sample Description:



Acquisition Method: Acido latico ion300 Developed by: Theodoro
 Column Type: RP18
 Pump A Type: L-7100
 Solvent A: HAc 1% Solvent B: H2SO4 8,5mM
 Solvent C: Metanol Solvent D: ACN
 Method Description: Método para determinação de ácido láctico. Usando coluna Transgenomic ice-ion 300. Curvas de calibração série 4663 do glicerol, também na série 4731 e 5003 (Lactose PA).

Chrom Type: HPLC Channel : 2

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

No.	RT	Name	Area	Conc 1 g/L	BC
1	11,90		15353688	0,000000	BB
2	21,84	Glicerol	721408	0,341226	BB
3	33,81	Etanol	306482	0,271145	BB
			16381578	0,612371	

Peak rejection level: 5000

Figura 39. Cromatograma do glicerol proveniente da extração de biodiesel de rota etílica, sintetizado na PUCRS.

Anexo 2 – Gráficos utilizados para cálculos cinéticos

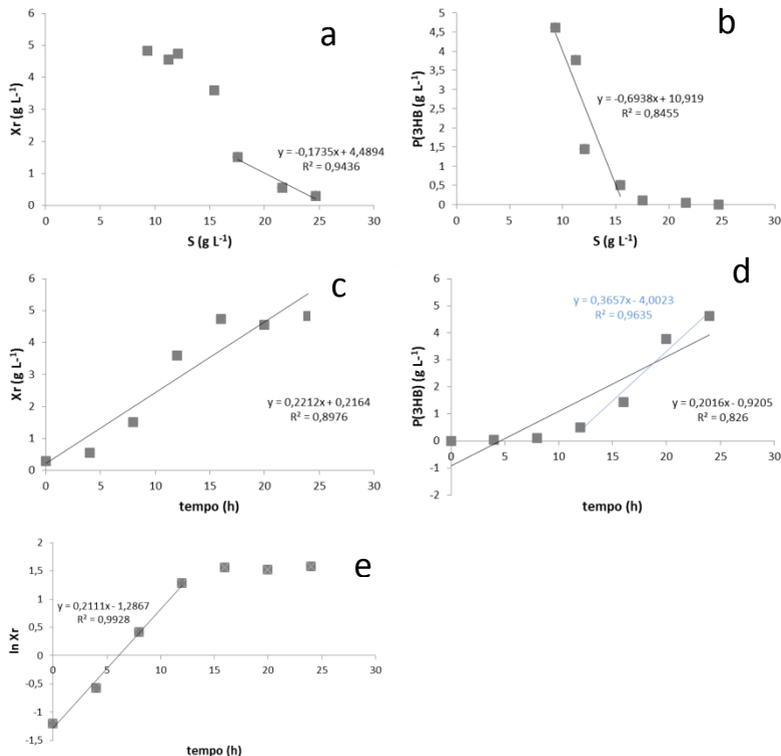


Figura 40. Gráficos utilizados para cálculos cinéticos do ensaio em frascos agitados a 150 min⁻¹ e 38 °C com 30 g L⁻¹ de açúcar invertido. (a) cálculo do fator de conversão de substrato em célula, (b) cálculo do fator de conversão de substrato em produto, (c) cálculo da produtividade em célula, (d) cálculos da produtividade global em polímero e da produtividade em polímero na fase de produção e (e) cálculos da velocidade específica de crescimento.

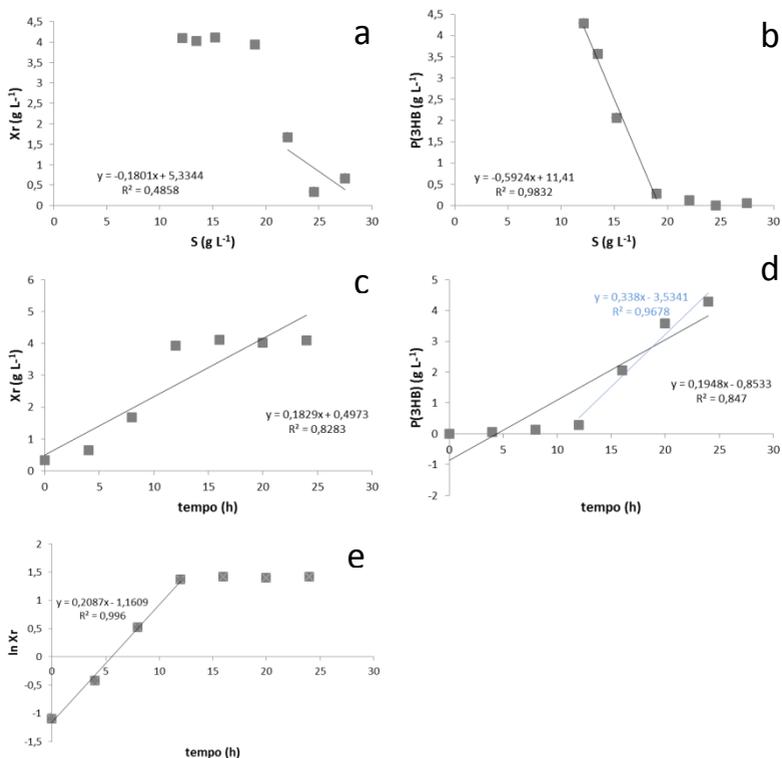


Figura 41. Gráficos utilizados para cálculos cinéticos do ensaio em frascos agitados a 150 min^{-1} e $38 \text{ }^\circ\text{C}$ com 15 g L^{-1} de açúcar invertido e 15 g L^{-1} de glicerol. (a) cálculo do fator de conversão de substrato em célula, (b) cálculo do fator de conversão de substrato em produto, (c) cálculo da produtividade em célula, (d) cálculos da produtividade global em polímero e da produtividade em polímero na fase de produção e (e) cálculos da velocidade específica de crescimento.

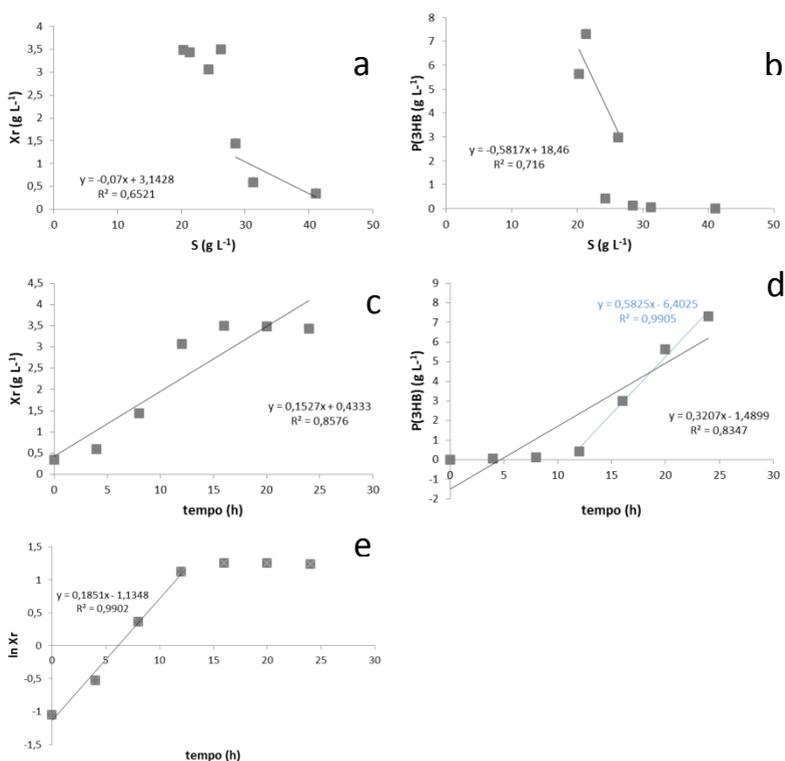


Figura 42. Gráficos utilizados para cálculos cinéticos do ensaio em frascos agitados a 150 min^{-1} e $38 \text{ }^\circ\text{C}$ com 30 g L^{-1} de açúcar invertido e 15 g L^{-1} de glicerol. (a) cálculo do fator de conversão de substrato em célula, (b) cálculo do fator de conversão de substrato em produto, (c) cálculo da produtividade em célula, (d) cálculos da produtividade global em polímero e da produtividade em polímero na fase de produção e (e) cálculos da velocidade específica de crescimento.

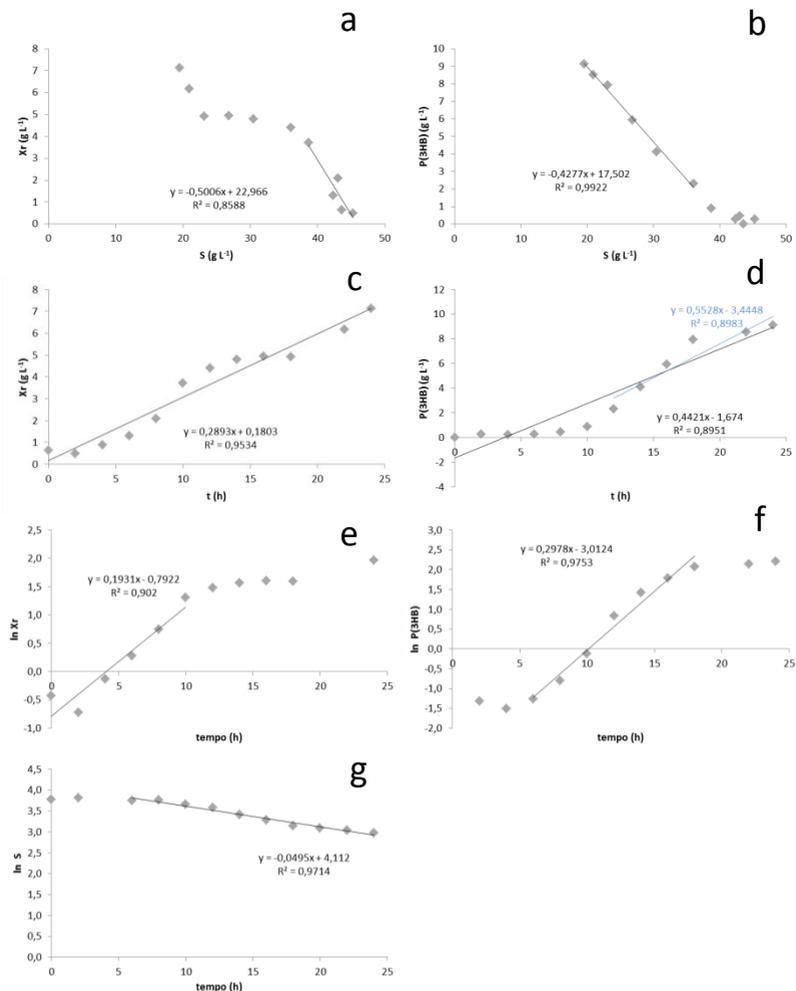


Figura 43. Gráficos utilizados para cálculos cinéticos do ensaio em biorreator a 38 °C com 30 g L⁻¹ de açúcar invertido e 15 g L⁻¹ de glicerol (AI/GP). (a) fator de conversão de substrato em célula, (b) fator de conversão de substrato em produto, (c) produtividade em célula, (d) produtividade global em polímero e da produtividade em polímero na fase de produção, (e) velocidade específica de crescimento $\mu_{máx}$, (f) velocidade específica de produção de P(3HB) e (g) velocidade específica de consumo do substrato.

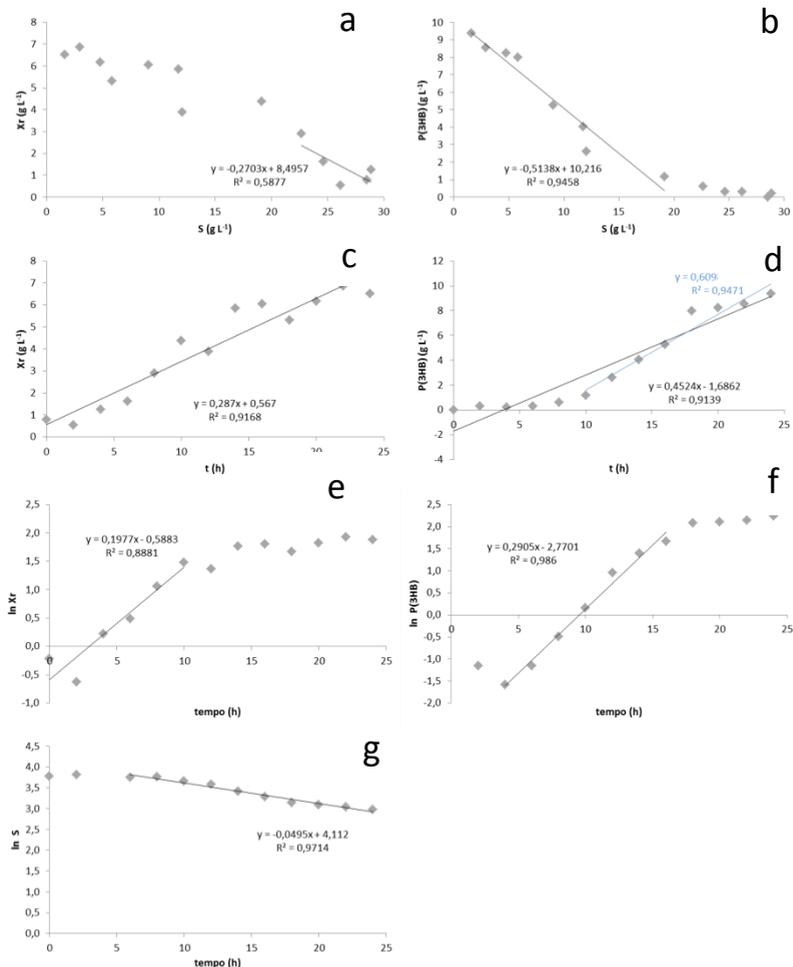


Figura 44. Gráficos utilizados para cálculos cinéticos do ensaio em biorreator a 38 °C com 30 g L⁻¹ de açúcar invertido e sem glicerol (AI/SG). (a) cálculo do fator de conversão de substrato em célula, (b) cálculo do fator de conversão de substrato em produto, (c) cálculo da produtividade em célula, (d) cálculos da produtividade global em polímero e da produtividade em polímero na fase de produção, (e) cálculo da velocidade específica de crescimento μ_{\max} , (f) velocidade específica de produção de P(3HB) e (g) velocidade específica de consumo do substrato.