



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA POLITÉCNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**EFEITO DA GLICERINA RESIDUAL DO BIODIESEL E DE ESTIRPES  
MICROBIANAS (*Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT  
438) NA PRODUÇÃO, PROPRIEDADES E COMPOSIÇÃO DE  
COPOLÍMEROS DE POLIHIDROXIALCANOATOS**

PAULO LEONARDO LIMA RIBEIRO

Salvador

2014

EFEITO DA GLICERINA RESIDUAL DO BIODIESEL E DE ESTIRPES  
MICROBIANAS (*Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT  
438) NA PRODUÇÃO, PROPRIEDADES E COMPOSIÇÃO DE  
COPOLÍMEROS DE POLIHIDROXIALCANOATOS

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janice Izabel Druzian

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Mestrado em Engenharia Química da UFBA – Escola Politécnica, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química, Área de Concentração: Biotecnologia.

Salvador

2014

## TERMO DE APROVAÇÃO

# **EFEITO DA GLICERINA RESIDUAL DO BIODIESEL E DE ESTIRPES MICROBIANAS (*Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438) NA PRODUÇÃO, PROPRIEDADES E COMPOSIÇÃO DE COPOLÍMEROS DE POLIHIDROXIALCANOATOS**

Paulo Leonardo Lima Ribeiro

DISSERTAÇÃO APROVADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA, PELA SEGUINTE BANCA EXAMINADORA:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janice Izabel Druzian

Doutora em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)  
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

---

Dr<sup>a</sup>. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma

Doutora em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo (USP)  
Universidade Estadual de São Paulo (UNESP)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nadia Mamede José

Doutora em Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)  
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Katerine Carvalho Lima Lobato

Doutora em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)  
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Março de 2014

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

Aos meus amados pais, Vânia Maria Lima Ribeiro e Paulo Alberto Torres Ribeiro (*in memoriam*) por todo o amor, incentivo, dedicação e esforços em prol da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por ter sempre iluminado meu caminho.

Agradeço imensamente a minha Família, minha mãe Vânia Maria Lima Ribeiro e aos meus (minhas) tios (as), primos (as), vó e vô, que verdadeiramente acreditaram e torceram por mim.

Aos companheiros de Laboratório Denilson, Márcio, Larissa, Tamiris, Ananda, Augusto, Lídia, Andrea, Lívia, Luciane, Carol, Jânia, Diego, Paula, Gleice e Jaff, que diretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho, muito obrigado pelo companheirismo, pelos ensinamentos e pela boa vontade de todos.

À Professora Janice Izabel Druzian pela orientação, comprometimento e pela confiança depositada em meu trabalho.

Às professoras Ana Katerine Carvalho Lima Lobato, Nadia Mamede José e Ingrid Graça Ramos pelas sugestões, que muito contribuíram para este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFBA, pelo aprimoramento profissional.

À CAPES pela bolsa concedida durante a realização do curso, e apoio financeiro através do projeto Nanobiotec 757/2009.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>iii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>v</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>x</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>3</b>
2.1 Objetivo geral .....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
3.1 Biopolímeros .....	4
3.1.1 Classificação dos Biopolímeros .....	4
3.1.2 Mercado e Custos de Produção de Biopolímeros.....	5
3.2 Polihidroxicanoatos .....	9
3.2.1 Propriedades e Características dos PHAs.....	10
3.2.2 Aplicações .....	13
3.2.3 Biodegradabilidade.....	14
3.2.4 Produção de PHAs.....	16
3.2.4.1 Micro-organismos Produtores .....	17
3.2.4.1.1 <i>Cupriavidus necator</i> .....	19
3.2.4.1.2 Bactérias do gênero <i>Burkholderia</i> .....	20
3.2.4.2 Biossíntese de PHAs.....	21
3.3 Glicerol e Glicerina .....	22
3.3.1 Características e Propriedades .....	22
3.3.2 Aplicações da Glicerina.....	23
3.3.3 Glicerina Residual do Biodiesel .....	24
3.3.4 Conversão Microbiológica da Glicerina.....	26
3.4 Técnicas de Caracterização de Polímeros .....	27
3.4.1 Métodos Espectroscópicos (Infravermelho).....	27
3.4.2 Análise de Difração de Raios-X (DRX).....	28

3.4.3	Análises Térmicas .....	29
3.4.3.1	Análise Termogravimétrica (TGA) .....	29
3.4.3.2	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	30
3.4.4	Determinação de Massa Molecular .....	31
3.4.4.1	Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) .....	32
3.4.5	Cromatografia à Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-MS).....	34
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
4.1	Micro-organismos.....	35
4.2	Principais fontes de carbono.....	35
4.3	Composição das fontes de carbono .....	35
4.3.1	Composição centesimal .....	35
4.3.2	Determinação de ácidos graxos das glicerinas residuais do biodiesel .....	36
4.3.2.1	Derivação da fração lipídica.....	36
4.3.2.2	Composição de ácidos graxos .....	36
4.3.3	Determinação de minerais e metais das fontes principais de carbono e PHAs .....	37
4.4	Meios de cultura .....	38
4.5	Processo de cultivo para produção de PHA .....	39
4.6	Separação celular do meio de cultivo.....	40
4.7	Extração de PHA da célula.....	40
4.8	Caracterização de PHA.....	42
4.8.1	Infra-vermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	42
4.8.2	Difratometria de Raios-X (DRX) .....	43
4.8.3	Análise Termogravimétrica (TGA) .....	43
4.8.4	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	44
4.8.5	Massa Molecular (Mw) .....	44
4.8.6	Composição de hidroxiésteres dos copolímeros de PHAs por cromatografia à gás acoplado à espectrometria de massas (CG-MS) .....	45
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
5.1	Composição das glicerinas residuais do biodiesel (GRBs) de diferentes fontes.....	46
5.2	Efeito das diferentes fontes de glicerinas residuais do biodiesel (GRBs) na produção de biomassa e de copolímeros de PHAs.....	48
5.3	Caracterização dos PHAs .....	52
5.3.1	Composição de minerais e metais .....	52

5.3.2	Infra-vermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	53
5.3.3	Difratometria de Raios-X (DRX) .....	54
5.3.4	Análise Termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	56
5.3.5	Massa molecular (Mw).....	60
5.3.6	Composição de hidroxiésteres dos copolímeros de PHAs .....	62
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>68</b>



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estimativa do mercado de biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes para o ano de 2015 no Brasil. PE verde = 48 %; PVC verde = 27 %; Amido = 23 %; PLA = 1 % e PHB = 1 % (BRITO et al., 2011). ..... 8
- Figura 2.** Micrografia eletrônica de transmissão de células de *Cupriavidus necator* contendo 90 % em massa de grânulos de poli(3-hidroxi-butirato) no interior de células (GARCIA, 2006). ..... 9
- Figura 3.** Estrutura molecular geral dos polihidroxi-alcanoatos (PHAs), com  $m = 1$  a 13, porém 1 sendo mais comum,  $n$  variando de 100 a milhares de unidades e R variável (BRITO et al., 2011). ..... 11
- Figura 4.** Degradação de embalagem de [P(3HB-co-HV)] em lodo de tratamento de efluentes (CARMINATTI et al., 2006). ..... 15
- Figura 5.** Ciclo fechado de produção de polihidroxi-alcanoato (PHA) (DALCANTON, 2006). ..... 16
- Figura 6.** Fluxograma do processo de obtenção de PHB (BIOCYCLE, 2012). ..... 17
- Figura 7.** Rotas metabólicas envolvidas na biossíntese de PHAs. PhaA,  $\beta$ -cetotiolase; PhaB, acetoacetil-CoA redutase NADPH-dependente; PhaC, PHA sintase (TAKAHASHI, 2012). .21
- Figura 8.** Processo de produção de biodiesel e recuperação de álcool da glicerina (MENDES & SERRA, 2012). ..... 25
- Figura 9.** Representação gráfica do princípio de cromatografia por exclusão (SPIER, 2005). ..... 33
- Figura 10.** Representação esquemática do processo de cultivo por agitador rotativo para produção de PHA. ..... 40
- Figura 11.** Fluxograma completo de produção de PHA. .... 42
- Figura 12.** Espectros de FTIR dos PHAs produzidos por *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438 a partir de glicose, glicerina P.A., GRB I (oriunda do processamento do biodiesel de soja), GRB II (oriunda do processamento do biodiesel de óleos e gorduras residuais) e GRB III (oriunda do processamento do biodiesel de mamona). ..... 54
- Figura 13.** Difractogramas de raios-X dos PHAs produzidos pelas cepas *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438 a partir de glicose, glicerina P.A., GRB I (oriunda do processamento do biodiesel de soja), GRB II (oriunda do processamento do biodiesel de óleos e gorduras residuais) e GRB III (oriunda do processamento do biodiesel de mamona). 55

- Figura 14.** Curvas termogravimétricas (TGAs) e derivadas primeira (DTGs) dos PHAs produzidos por *Cupriavidus necator* IPT 027 (a e b) e *Burkholderia cepacia* IPT 438 (c e d) a partir de glicose, glicerina P.A., GRB I (oriunda do processamento do biodiesel de soja), GRB II (oriunda do processamento do biodiesel de óleos e gorduras residuais) e GRB III (oriunda do processamento do biodiesel de mamona). .....57
- Figura 15.** Termogramas (DSC) dos PHAs produzidos por *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438 a partir de glicose, glicerina P.A., GRB I (oriunda do processamento do biodiesel de soja), GRB II (oriunda do processamento do biodiesel de óleos e gorduras residuais), e GRB III (oriunda do processamento do biodiesel de mamona). .....59
- Figura 16.** Cromatogramas CLAE-IR dos PHAs produzidos pelas cepas *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438 a partir de GRB III (A) oriunda do processamento do biodiesel de mamona, GRB II (B) oriunda do processamento do biodiesel de óleos e gorduras residuais, GRB I (C) oriunda do processamento do biodiesel de soja; glicerina P.A. (D) e glicose (E). .....60
- Figura 17.** Cromatogramas CG-MS: PHA produzido por *Cupriavidus necator* IPT 027 com GRB III (oriunda do processamento do biodiesel de mamona); PHA produzido por *Burkholderia cepacia* IPT 438 com glicose. ....63
- Figura 18.** Espectros de massa (NIST) de 3HB (Tr = 4,31'), 3HTD (Tr = 6,96'), 15HPD (Tr = 7,49') e 11HHD (Tr = 9,06'). .....64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais produtores de PHA no mundo. ....	6
<b>Tabela 2.</b> Comparação entre as principais características do P(3HB), PHBV, PP e do PEAD. .....	12
<b>Tabela 3.</b> Produção de PHA ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e o percentual de extração (%), a partir de diversas fontes principais de carbono e cepas microbianas.....	18
<b>Tabela 4.</b> Bandas características no espectro de infravermelho para o [P(3HB)]. ....	27
<b>Tabela 5.</b> Faixas lineares e limites de detecção dos analitos (metais e minerais) investigados. .....	38
<b>Tabela 6.</b> Composição do Meio Mineral (MM). ....	39
<b>Tabela 7.</b> Composição da solução de oligoelementos. ....	39
<b>Tabela 8.</b> Composição química das fontes principais de carbono utilizadas na etapa de fermentação em agitador orbital rotativo para obtenção de PHA. ....	46
<b>Tabela 9.</b> Concentração de ácidos graxos das glicerinas residuais do biodiesel (GRBs) I, II e III em mg por 100g de amostra e em percentagem (%). ....	48
<b>Tabela 10.</b> Produção quantitativa de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) a partir de diferentes linhagens bacterianas e distintas fontes de carbono em agitador orbital rotativo (35 °C, 24 h, pH 7, 150 rpm). ....	49
<b>Tabela 11.</b> Produção quantitativa de PHA ( $\text{g.L}^{-1}$ ) a partir de diferentes linhagens bacterianas e distintas fontes de carbono em agitador orbital rotativo (35 °C, 24 h, pH 7, 150 rpm).....	49
<b>Tabela 12.</b> Percentual de extração de PHA (%), por diferentes micro-organismos e distintas fontes de carbono em agitador orbital rotativo (35 °C, 24 h, pH 7, 150 rpm). ....	51
<b>Tabela 13.</b> Composição de minerais em PHAs produzidos pelas cepas <i>Cupriavidus necator</i> IPT 027 e <i>Burkholderia cepacia</i> IPT 438 a partir de glicose, glicerina P.A. e GRBs I, II e III. .....	52
<b>Tabela 14.</b> Grau de cristalinidade de PHAs produzidos pelas cepas <i>Cupriavidus necator</i> IPT 027 e <i>Burkholderia cepacia</i> IPT 438 a partir de glicose, glicerina P.A. e GRBs I, II e III, por método de difratometria.....	56
<b>Tabela 15.</b> Propriedades termo-físicas dos PHAs produzidos pelas cepas <i>Cupriavidus necator</i> IPT 027 e <i>Burkholderia cepacia</i> IPT 438 a partir de glicose, glicerina P.A. e GRBs I, II e III. .....	59

**Tabela 16.** Massas moleculares (Mw) dos PHAs produzidos pelas cepas *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438 a partir de glicose, glicerina P.A. e GRBs I, II e III.  
.....61

**Tabela 17.** Composição (%) dos PHAs produzidos pelas cepas *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438 a partir de glicose, glicerina P.A. e glicerinas GRBs I, II e III.  
.....65

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% C:	Grau de cristalinidade (por DRX)
% $\chi_c$ :	Grau de cristalinidade (por DSC)
[P(11HHD)]:	Poli(11-hidroxihexadecanoato)
[P(15HPD)]:	Poli(15-hidroxipentadecanoato)
[P(3HB- <i>co</i> -HV)]:	Poli(3-hidroxibutirato- <i>co</i> -hidroxivalerato)
[P(3HTD)]:	Poli(3-hidroxitetradecanoato)
[P(4HV)]:	Poli(4-hidroxivalerato)
[P(5HHx)]:	Poli(5-hidroxihexanoato)
$\Delta H_m$ :	Entalpia de fusão
$\Sigma$ AGMI:	Somatório de Ácidos Graxos Monoinsaturados
$\Sigma$ AGPI:	Somatório de Ácidos Graxos Poliinsaturados
$\Sigma$ AGS:	Somatório de Ácidos Graxos Saturados
3HB:	Ácido 3-hidroxibutírico
3HHep:	Ácido 3-hidroxieptanóico
3HHx:	Ácido 3-hidroxihexanóico
3HV:	Ácido 3-hidroxivalérico
3MB:	3-mercaptobutirato
3MP:	3-mercaptopropionato
3MV:	3-mercaptovalerato
AcetilCoA:	Acetilcoenzima A
AG:	Ácido Graxo
ANP:	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ASTM:	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ATR:	Reflectância Total Atenuada
BF <sub>3</sub> :	Fluoreto de boro
CEN:	<i>European Committee for Standardization</i>
CG-MS:	Cromatografia à Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas
CLAE:	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
d:	Distância entre camadas adjacentes de átomos
DIN:	<i>German Institute for Standardization</i>

DRX:	Difratometria de Raios-X
DSC:	Calorimetria Exploratória Diferencial
FTIR:	Infravermelho com Transformada de Fourier
GPC:	Cromatografia de Permeação em Gel
GRB:	Glicerina Residual do Biodiesel
I <sub>a</sub> :	Área sob o halo amorfo
I <sub>c</sub> :	Somatório das áreas dos picos cristalinos
IPT:	Instituto de Pesquisas Tecnológicas
IR:	Índice de Refração
ISO:	<i>International Standards Organization</i>
JIS:	<i>Japanese Institute for Standardization</i>
LoD:	Limite de Detecção
LT:	Lipídios Totais
MF:	Meio Final
MM:	Meio Mineral
M <sub>n</sub> :	Massa molecular numérica média
M <sub>v</sub> :	Massa molecular viscosimétrica média
M <sub>w</sub> :	Massa molecular ponderal média
n:	Número inteiro positivo
NA:	Ágar Nutriente
ND:	Não Detectado
NE:	Caldo Nutriente
NI:	Não Identificado
NIST:	National Institute of Standards and Technology
PCL:	Poli(caprolactona)
PEAD:	Polietileno de Alta Densidade
P <sub>F</sub> :	Concentração final de células
PHA:	Polihidroxialcanoato
PHB:	Polihidroxibutirato
PHBH:	Poli(hidroxibutirato- <i>co</i> -3-hidroxi-hexanoato)
PHBV:	Poli(hidroxivalerato)
PI:	Padrão Interno
PLA:	Poli(ácido lático)

$P_0$ :	Concentração inicial de células
PP:	Polietileno
$S_F$ :	Concentração inicial de substrato
$S_0$ :	Concentração final de substrato
$T_{decomp}$ :	Temperatura máxima de decomposição
$T_{on\ set}$ :	Temperatura inicial de degradação
TCA:	Ácido tricarboxílico
$T_g$ :	Temperatura de transição vítrea
TGA:	Análise Termogravimétrica
$T_m$ :	Temperatura de fusão
UV:	Luz Ultravioleta
$Y_{P/S}$ :	Fator de conversão de substrato a produto
$\theta$ :	Ângulo entre os raios incidentes e os planos refletidos
$\lambda$ :	Comprimento de onda

Resumo da Dissertação apresentado ao Programa de Mestrado em Engenharia Química como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

EFEITO DA GLICERINA RESIDUAL DO BIODIESEL E DE ESTIRPES MICROBIANAS  
(*Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438) NA PRODUÇÃO,  
PROPRIEDADES E COMPOSIÇÃO DE COPOLÍMEROS DE  
POLIHIDROXIALCANOATOS

## RESUMO

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres produzidos por um grande número de estirpes bacterianas, em condições de crescimento limitante. Estes polímeros são completamente biodegradáveis e, por conseguinte, materiais alternativos para fins de substituição dos termoplásticos sintéticos. No entanto, os PHAs, ainda, não têm sido capazes de competir com as resinas convencionais, devido ao elevado custo de processo. Uma forma possível de reduzir os custos de produção é a utilização de fontes de carbono mais baratas, como os coprodutos da indústria do biodiesel. Deste modo, estirpes de *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438 foram utilizadas, em estudo, a fim de sintetizar PHAs a partir de distintas gliceras residuais do biodiesel (GRBs) derivadas, por sua vez, do processamento do biodiesel de soja (GRB I), óleos e gorduras residuais (GRB II) e mamona (GRB III). Diferentes variáveis foram mantidas constantes durante a produção de PHA, obtendo-se um percentual máximo de extração de 71,07 %, quando se fez uso da cepa *Cupriavidus necator* IPT 027 em cultivo com GRB II. As análises de CG-MS revelaram copolímeros de PHAs com hidroxísteres de cadeia curta (3HB) e de cadeia média (3HTD, 15HPD e 11HHD), com distintas frações em %mol. Tais resultados relacionam-se com o meio de cultivo, as altas massas moleculares obtidas (552 kDa a 8240 kDa), as temperaturas de fusão (139,8 °C a 175,9 °C) e os graus de cristalinidade verificados por DRX (35,92 % a 66,07 %) e DSC (33,30 % a 57,80 %). Além disso, observou-se uma versatilidade da cepa *Burkholderia cepacia* IPT 438 perante as fontes de carbono estudadas, principalmente no que concerne às propriedades dos biopoliésteres. Portanto, majoritariamente, os biopoliésteres produzidos obtiveram, segundo a literatura, propriedades aplicáveis em nível industrial, porém torna-se fundamental o controle otimizado do processo de cultivo, a fim de



potencializar a produção e propriedades de copolímeros de PHAs, adequando-os as mais diversas aplicações tecnológicas.

**Palavras-chave:** copolímero, polihidroxialcanoato, glicerina residual do biodiesel, *Cupriavidus necator* IPT 027, *Burkholderia cepacia* IPT 438.

Abstract of Dissertation presented to Chemistry Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Master in Chemistry Engineering.

EFFECT OF RESIDUAL GLYCERIN FROM BIODIESEL AND BACTERIAL STRAINS  
(*Cupriavidus necator* IPT 027 and *Burkholderia cepacia* IPT 438) IN THE PRODUCTION,  
PROPERTIES AND COMPOSITION OF COPOLYMERS OF  
POLYHYDROXYALKANOATES

**ABSTRACT**

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polyesters produced by a large number of bacterial strains capable of growth limiting. These polymers are fully biodegradable and, therefore, alternative materials for replacement of synthetic thermoplastics. However, the PHAs have not yet been able to compete with conventional resins due to the high cost of the process. One possible way to reduce the cost of production is the use of cheaper sources of carbon, such as byproducts of biodiesel industry. Thus, the strains *Cupriavidus necator* IPT 027 and *Burkholderia cepacia* IPT 438 were used in the study, to synthesize PHAs from various residual glycerins biodiesel (RGBs) derived in turn from the processing of soybean biodiesel (RGB I), residual fats and oils (RGB II) and castor bean oil (RGB III). Different variables were kept constant during the subsequent microbial growth and PHA production, obtaining a maximum yield, in percent, of 71.07 % when we used the strain *Cupriavidus necator* IPT 027 in culture with RGB II. The GC-MS analyzes revealed copolymers of PHA with hydroxyesters of short-chain (3HB) and medium-chain (3HTD, 15HPD and 11HHD), with different factions in mol %. These results relate to the culture medium, the high molecular weight obtained (552 kDa to 8240 kDa), the melting temperature (from 139.8 °C to 175.9 °C) and crystallinity degrees checked by XRD (35.92 % to 66.07 %) and DSC (33.30 % to 57.80 %). In addition, it was observed a versatility of the strain *Burkholderia cepacia* IPT 438 before the carbon sources studied, especially with regard to the properties of biopolyesters. Therefore, majority- the biopolymers produced obtained, according to the literature, relevant properties at the industrial level, but it becomes essential to optimal control of the cultivation process in order to enhance the production and properties of copolymers of PHAs, adjusting them the most several technological applications.

**Keywords:** copolymer, polyhydroxyalkanoate, residual glycerin from biodiesel, *Cupriavidus necator* IPT 027, *Burkholderia cepacia* IPT 438.

## *Capítulo 1 – Introdução*

### **1 INTRODUÇÃO**

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são biopoliésteres acumulados, intracelularmente, por inúmeros micro-organismos em condições limitantes de N (nitrogênio), P (fósforo), Mg (magnésio), O (oxigênio), K (potássio) ou S (enxofre) e em excesso de fonte de carbono (GARCÍA Y.G. et al., 2013). O PHB (polihidroxibutirato) é o PHA mais comumente encontrado, sendo um biopolímero termoplástico e biocompatível, com propriedades semelhantes aos polímeros sintéticos (BARUD et al., 2011). Entretanto, segundo Laycock et al. (2013), Khosravi-Darani et al. (2013) e Barud et al. (2011), os PHBs são termicamente instáveis, frágeis e altamente cristalinos. As principais aplicações para PHB incluem materiais cirúrgicos, embalagens e itens descartáveis, como copos e fraldas (WANG et al., 2013).

Como os PHAs são biodegradáveis, eles são considerados potenciais substitutos para os termoplásticos derivados do petróleo, tais como polietileno e polipropileno (YU & SI, 2001). Apesar de os biopolímeros estarem ganhando espaço no mercado devido aos problemas ambientais gerados pelos polímeros sintéticos, seu elevado custo de produção restringe a sua aplicação industrial (KHOSRAVI-DARANI et al., 2013; POSADA et al., 2011).

Estudos mostraram que o valor da fonte de carbono pode contribuir com até 40 a 70 % dos custos de produção (VAN-THUOC et al., 2008; POSADA et al., 2011 e KHOSRAVI-DARANI et al., 2013). Constatou-se, portanto, que um dos principais obstáculos para uma ampla utilização de PHAs como termoplásticos é o alto custo da fonte de carbono utilizada na sua produção. Sendo assim, o emprego de rejeitos ou coprodutos da indústria do biodiesel pode ser uma alternativa promissora para serem utilizados como fontes principais de carbono, já que apresentam duas características bastante desejáveis: baixo custo e alta disponibilidade (NARANJO et al., 2013).

O biodiesel obtido na transesterificação lipídica gera um fluxo de glicerina residual ou bruta, que representa em peso, 10 % do biodiesel total produzido (CAVALHEIRO et al., 2012). Embora o glicerol (glicerina pura) seja uma importante matéria-prima industrial, a fase rica em glicerol do biodiesel, ou seja, a glicerina residual tem um valor relativamente baixo devido à presença de impurezas, tais como metanol e sais de mono e diglicerídios (CAVALHEIRO et al., 2012; SPOLJARIC et al., 2013). No entanto, estes resíduos de glicerina têm um alto potencial de conversão em uma grande variedade de produtos de valor

## Capítulo 1 – Introdução

agregado (JOHNSON & TACONI, 2007). Deste modo, a produção de PHA com base na fermentação microbiana da glicerina residual do biodiesel pode contribuir para a redução dos custos associados ao processo de cultivo (CAVALHEIRO et al., 2012; DROBOTH et al., 2011).

Ainda, de acordo com Naranjo et al. (2013), a produção de PHB por *Bacillus megaterium* apresentou rendimento semelhante quando glicerol e glicose foram utilizados como fontes principais de carbono. Em comparação com a glicose, o glicerol mostrou um decréscimo de 10 a 20 % nos custos de produção de PHB, por meio de dois sistemas de cultivo diferentes (agitador orbital rotativo e biorreator de 3,7 L, respectivamente). Além disso, a margem de lucro de 20 % no preço de venda de PHB utilizando glicerol como fonte principal de carbono resultou em uma valorização de 166 % da glicerina residual. Os autores relataram a viabilidade de emprego de glicerol como matéria-prima para a produção de PHB em escalas de laboratório (até 60 % de acumulação de PHB) e industrial (2,6 \$/Kg de PHB).

Aliado a diminuição dos custos de produção, a fim de aumentar a competitividade comercial dos PHAs, deve-se melhorar também a processabilidade do polímero. Mais de 150 monômeros formados por hidroxiésteres de ácidos graxos com cadeia carbônica, contendo de quatro a milhares de carbonos podem ser combinados dentro da família dos PHAs, resultando em polímeros com propriedades extremamente diferenciadas, destinados as mais diversas aplicações (KHOSRAVI-DARANI et al., 2013).

Os PHAs são produzidos por uma variedade de micro-organismos, tais como *Cupriavidus necator*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli* recombinante e *Burkholderia cepacia* (ZHU et al., 2012). Recentemente, *Burkholderia cepacia* destacou-se por produzir altas quantidades de biomassa e de PHB (23,6 g.L<sup>-1</sup> e 7,4 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, em um fermentador de 4 L), utilizando glicerinas derivadas do processamento de biodiesel (ZHU et al., 2010). *Cupriavidus necator*, também, tem sido amplamente estudado devido ao seu potencial na produção de quantidades significativas de PHB a partir de fontes de carbono simples, tais como glicose, ácido láctico, ácido acético (AKARAONYE et al., 2010) e glicerina residual (CAMPOS et al., 2013). Portanto, considerando os fatores mencionados acima, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a produção e propriedades de PHAs produzidos por *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438, em cultivo com distintas glicerinas residuais do biodiesel (GRBs).

## *Capítulo 2 – Objetivos*

### **2 OBJETIVOS**

#### **2.1 Objetivo geral**

Produzir e investigar as propriedades dos polihidroxicanoatos (PHAs), obtidos através da fermentação de distintas glicerinas residuais do biodiesel (GRBs) por *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438.

#### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar a composição centesimal das GRBs, obtidas a partir da produção de biodiesel de soja, óleos e gorduras residuais e mamona;
- Produzir PHAs por fermentação, em agitador orbital rotativo, tendo como principal fonte de carbono as GRBs;
- Caracterizar e estudar as propriedades dos PHAs produzidos por *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438 em meio contendo as GRBs;
- Analisar a viabilidade das distintas fontes de carbono e micro-organismos na produção de PHAs.

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Biopolímeros**

Os biopolímeros representam os componentes orgânicos mais abundantes na natureza. Eles são importantes para a vida cotidiana, tanto na forma de embalagens bioativas quanto na composição de itens alimentícios como geléias, pães, açúcares, dentre outros (FERREIRA, 2008). Exibem, ainda, importantes propriedades, como a biodegradabilidade e biocompatibilidade com inúmeras aplicações (CARDOZO, 2013). Biopolímeros, geralmente, são definidos como macromoléculas, sintetizadas por organismos vivos, formadas por moléculas idênticas ou muito similares ligadas covalentemente, formando uma grande cadeia (LUVIZETTO, 2007). A total biodegradação destes polímeros resulta em produtos como dióxido de carbono e água e, subsequentemente em adubos orgânicos, constituindo uma grande vantagem frente aos polímeros sintéticos (CARDOZO, 2013).

Alguns fatores ambientais e socioeconômicos estão relacionados ao crescente interesse pelos biopolímeros, os quais são: os grandes impactos ambientais causados pelos processos de extração e refino utilizados para produção dos polímeros provenientes do petróleo, a não biodegradabilidade da grande maioria dos polímeros sintéticos, uma vez que contribui para o acúmulo de lixo plástico sem destino apropriado que levará de dezenas a centenas de anos para ser novamente assimilado pela natureza, além da escassez do petróleo e o progressivo aumento do seu preço (BRITO et al., 2011).

Apesar de todas as vantagens, os biopolímeros possuem algumas limitações técnicas que tornam difícil sua processabilidade, e uso como produto final. Assim, muitos grupos de pesquisa vêm se dedicando ao estudo da modificação dos biopolímeros para viabilizar o processamento e uso dos mesmos em diversas aplicações (FECHINE, 2010). Para isso, blendas, compósitos e nanocompósitos têm sido estudados no intuito de melhorar propriedades como processabilidade, resistência térmica, propriedades mecânicas e reológicas, permeabilidade a gases e taxa de degradação (KUMAR et al., 2010).

##### **3.1.1 Classificação dos Biopolímeros**

Os biopolímeros são produzidos, principalmente, por três fontes: microbiana,

### *Capítulo 3 – Revisão bibliográfica*

polimerização monomérica e combinação monomérica, e deste modo são classificados. Em biopolímeros produzidos, diretamente, por micro-organismos, destacam-se: goma xantana e os copolímeros naturais: polihidroxicanoatos (PHAs), tal como 3-mercaptopropionato (3MP), 3-mercaptopbutirato (3MB) ou 3-mercaptovalerato (3MV) (CARDOZO, 2013). O grupo de biopolímeros produzidos a partir da polimerização monomérica incluem-se os polímeros constituídos por monômeros que existem na natureza ou são derivados de materiais que ocorrem naturalmente, por exemplo, ácido poliláctico, o politrimetileno-glicol e polióis à base de soja e seus derivados (VANDAMME et al., 2005). E por fim, os polímeros que mesclam monômeros de diferentes fontes naturais com monômeros de origem petroquímica, como o isosorbato-policarbonato e os poliuretanos a base de soja incluem-se em biopolímeros produzidos mediante combinação monomérica (CARDOZO, 2013).

Ainda, dentre os biopolímeros, estão os polímeros biodegradáveis, os quais a degradação resulta da ação de micro-organismos de ocorrência natural como bactérias, fungos e algas, podendo ser consumidos em semanas ou meses sob condições favoráveis de biodegradação. Vários autores utilizam, ainda, o adjetivo verde para se referirem a polímeros que durante sua síntese, processamento ou degradação produzem menor impacto ambiental que os polímeros convencionais (BRITO et al., 2011).

#### **3.1.2 Mercado e Custos de Produção de Biopolímeros**

O mercado dos biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes é ainda incipiente no Brasil, contudo, uma produção em larga escala, ainda, é esperada. Algumas dificuldades a serem superadas são o nível de consciência de utilização destes polímeros, que no Brasil é ainda muito baixo, representando um desafio considerável, e o seu custo e desempenho comparado aos das resinas convencionais (BRITO et al., 2011).

No estudo de Takahashi (2012), com uma análise econômica de produção de [P(3HB)], 3-poli-hidroxi-butilirato, com base nos dados já descritos na literatura, calculou-se o custo de produção do biopolímero em diversos cenários produtivos. O menor valor estimado foi de US\$ 2,6/Kg de [P(3HB)], porém ainda é um valor, segundo Takahashi (2012), acima do preço de mercado dos polímeros petroquímicos do qual o PHA possui potencial de substituição, a exemplo do polipropileno que no ano de 2010 atingiu o valor médio de 0,18,



### Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

0,19 e 0,24 US\$/Kg no mercado europeu, estadunidense e brasileiro, respectivamente (ABIPLAST, 2011).

Apesar dos preços vigentes ainda serem relativamente altos, o preço do PHA vem apresentando uma queda gradativa, segundo Takahashi (2012), pois a partir do levantamento realizado por Posada et al. (2011), verificou-se que as empresas têm conseguido aumentar a eficiência do processo (Tabela 1). A exemplo do PHB Industrial S/A, que ofertava o [P(3HB)] no ano de 2003 a um preço entre 12,5 a 15 US\$/Kg, já em 2010 esse valor foi reduzido para 3,1 a 3,7 US\$/Kg de polímero (POSADA et al., 2011; TAKAHASHI, 2012).

**Tabela 1.** Principais produtores de PHA no mundo.

Nome do produto: PHA	Empresa	Fonte principal de carbono	Preço (US\$/Kg)	Produção (ton/ano)
Biomer®: [P(3HB)]	Biotechnoly Co., Alemanha	Sacarose	25 (2003)	100 (2010)
			17 (2004)	
			3,75-6,25 (2010)	
Biocycle®: [P(3HB)]	PHB Industrial S/A, Brasil	Cana de açúcar ou sacarose	12,5-15 (2003)	30-60000 (2010)
			3,12-3,75 (2010)	
Biogreen®: [P(3HB)]	Mitsubishi GAS Química, Japão	Metanol	2,75 (2010)	10000 (2010)
Mirel™: [P(3HB)]	Metabolix, Telles, EUA	Sacarose	14-17 (2004) 2,13 (2010)	50000 (2010)
Enmat®: PHBV, PHBV+Ecoflex (blenda)	Tianan Biologic Material Co., Ltda. Ningbo, China	Glicose	4,64 (2010)	10000 (2010)
Nodax™: PHBH	P&G, EUA	Glicose	3,56 (2010)	20000-50000 (2010)

**Fonte:** POSADA et al. (2011) e CARDOZO (2013).

Para Lee e Choi (1997) *apud* Takahashi (2012), os principais itens que prejudicam a viabilidade econômica dos biopolímeros, especificadamente, dos PHAs são: produtividade; conteúdo total acumulado de PHA; complexidade da tecnologia aplicada; capital de investimento na planta de produção; o processo de extração/recuperação e as fontes de substrato e de nutrientes. Por isso, segundo Takahashi (2012), estudos têm sido conduzidos sobre: seleção de linhagens eficientes na conversão dos substratos em polímero; adição de suplementos nutricionais; utilização de insumos de baixo valor; desenvolvimento de técnicas de extração/recuperação mais eficientes e desenvolvimento de processos que permitam explorar ao máximo o potencial dos micro-organismos produtores.

Dentre os custos operacionais, os gastos com o meio de cultivo é o que mais contribui

### *Capítulo 3 – Revisão bibliográfica*

para os altos valores registrados na síntese do PHA, no qual o meio de cultivo incluindo a fonte de carbono representa cerca de 47 %, em média, dos custos de produção (TAKAHASHI, 2012). Por conta disto, Kim (2000) e Van-Thuoc et al. (2008) afirmam que estratégias de fermentação com alto conteúdo e produtividade de PHA a partir de fontes de carbono de baixo custo são imprescindíveis para a viabilidade econômica desta atividade. Neste contexto, diversas matérias-primas de baixo custo classificadas como recursos renováveis podem ser excelentes fontes de carbono para tal aplicação. Por exemplo, os resíduos do processamento da mandioca, o soro de leite, os óleos vegetais, o bagaço de maçã, o melão de beterraba e de cana-de-açúcar, a glicerina residual, a celulose, a hemicelulose, entre outros (STEINBÜCHEL & FÜCHTENBUSCH, 1998; SILVA & GOMEZ, 2007; TAKAHASHI, 2012).

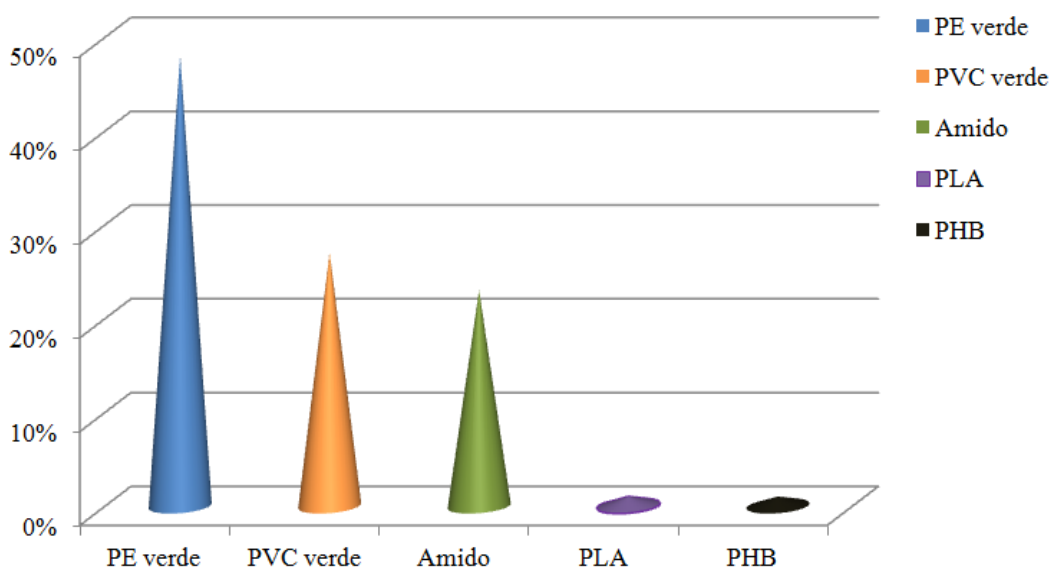
O desenvolvimento das indústrias do biodiesel no Brasil nos últimos anos tem registrado um aumento significativo em sua produção conforme dados da ANP (2011). Associado a esse crescimento, a glicerina residual que é o principal coproduto dessa atividade tem acompanhado essa tendência (RIVALDI et al., 2007). Conforme Dasari et al. (2005) e Posada et al. (2011), a glicerina residual é gerada em uma proporção de peso 1/10 (glicerina/biodiesel), e de acordo com Thompson e He (2006) para cada galão (3,8 L) de biodiesel produzido seja gerado 0,3 Kg de glicerina residual. Portanto, pode-se estimar um grande volume deste produto no mercado brasileiro, pois os dados de 2011, contabilizados pela ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) apontam uma produção de 736 mil litros de biodiesel, correspondendo a uma produção de 58 toneladas de glicerina residual (TAKAHASHI, 2012).

Frente ao aumento da oferta de glicerina no mercado brasileiro e mundial, associada à capacidade limitada de absorção dos mercados tradicionais deste produto pelas indústrias de doméstico, resina, farmacêutica, têxtil, alimentícia, bebidas e de tabacos (GONÇALVES et al., 2009; TAKAHASHI, 2012), a glicerina oriunda da produção do biodiesel apresenta-se como uma fonte principal de carbono de baixo custo para a produção de PHA, por isso recentemente muitos estudos têm focado o uso desta fonte de carbono seja na forma residual e/ou purificado para a produção do PHA, por meio do cultivo de *Cupriavidus necator* (CAVALHEIRO et al., 2009; POSADA et al., 2011), *Halomonas* sp. KM-1 (KAWATA & AIBA, 2010), *Escherichia coli* recombinante (ANDREEBEN et al., 2010) e culturas microbianas mistas (DROBOTH et al., 2010).

### Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

Posada et al. (2011) ao simularem a avaliação econômica da produção de PHA com o cultivo da bactéria *Cupriavidus necator* JMP 134, utilizando como fonte de carbono a glicerina residual ou o glicerol, descreveram o custo com substrato de 8 %. Valor inferior aos dados reportados na literatura, que em geral alcançam até 50 % dos custos globais (TAKAHASHI, 2012). Em relação aos custos de produção com a utilização da glicerina residual, Posada et al. (2011) relatam uma variação entre 2,1 a 2,4 US\$/Kg de [P(3HB)], e quando utilizado a glicerina purificada, os valores foram inferiores, com 1,9 a 2,4 US\$/Kg do biopolímero. Ainda, com relação aos referidos autores, os custos diferem em decorrência das impurezas (sais, ésteres, álcool) contidas na glicerina residual que afetam os processos metabólicos do micro-organismo produtor, uma vez que o organismo produziu 4,5 g.L<sup>-1</sup> de PHA no meio acrescido de glicerina residual, enquanto na condição suplementada da fonte de carbono purificada, atingiu 7,3 g.L<sup>-1</sup> de polímero (TAKAHASHI, 2012).

O mercado atual de biopolímeros e polímeros biodegradáveis no Brasil é representado pelos seguintes fornecedores: Cargill (PLA); Biomater (amido); PHB Industrial (PHB, PHB-HV); Basf (Ecoflex®, blenda de Ecoflex®/Amido – Ecobras® e blenda de Ecoflex®/PLA – Ecovio®); Corn Products (amido e Ecobras®); e Perstorp (PCL) (FECHINE, 2010). A Figura 1 ilustra uma estimativa para o ano de 2015 do mercado dos biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes no Brasil.



**Figura 1.** Estimativa do mercado de biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes para o ano de 2015 no Brasil. PE verde = 48 %; PVC verde = 27 %; Amido = 23 %; PLA = 1 % e PHB = 1 % (BRITO et al., 2011).

### **3.2 Polihidroxicanoatos**

A família dos poliésteres microbiológicos, classificada como polihidroxicanoatos, tem recebido considerável atenção graças ao uso potencial desses polímeros como termoplásticos ambientalmente amigáveis (MARANGONI, 2000 *apud* FORMOLO et al., 2003). Os polihidroxicanoatos são poliésteres naturais sintetizados, intracelularmente, e acumulados (Figura 2) sob condição de excesso de carbono e limitação de outros nutrientes, por inúmeros micro-organismos (HORNG et al., 2013). Além disso, podem ser produzidos a partir de matérias-primas renováveis, como o açúcar de cana, materiais amiláceos e óleos vegetais (VANZIN, 2008).



**Figura 2.** Micrografia eletrônica de transmissão de células de *Cupriavidus necator* contendo 90 % em massa de grânulos de poli(3-hidroxibutirato) no interior de células (GARCIA, 2006).

Os PHAs apresentam características bastante similares as dos polímeros derivados do petróleo, devido, principalmente, a sua elevada massa molecular (GARCÍA Y.G. et al., 2013). Além disso, são completamente degradados a água e dióxido de carbono sob condições aeróbias, e a metano e água sob condições anaeróbias (REDDY et al., 2003). Essa degradação ocorre pela ação das enzimas despolimerases, deste modo inúmeros micro-organismos são capazes de excretar tais enzimas, as quais agem hidrolisando o PHA em oligômeros solúveis em água e monômeros, que podem ser utilizados como nutrientes para célula (SCHMIDT, 2011).

## Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

Esse grupo de polímeros foi descoberto em 1923, quando o microbiologista francês Maurice Lemoigne do Instituto Pasteur observou a presença de poli(3-hidroxi-3-butanóico) em bactérias do gênero *Bacillus* (VANZIN, 2008). Por muitos anos, o ácido 3-hidroxi-3-butanóico (3HB) foi o único constituinte conhecido dos polihidroxicarboxilatos, até que em 1964, identificou-se o ácido-3-hidroxi-2-butenóico produzido por uma bactéria do gênero *Nocardia*. Em 1972, a partir de estudos com lodo de esgoto, foi verificada a presença de outros constituintes, como os ácidos 3-hidroxi-3-pentanoico (3HV), 3-hidroxi-3-hexanoico (3HHx) e 3-hidroxi-3-heptanoico (3HHep). Em 1976, a empresa Imperial Chemical Industries (ICI) iniciou estudos para a produção de poli(3-hidroxi-3-butanóico), a partir da linhagem *Cupriavidus necator*, como uma alternativa aos plásticos obtidos do petróleo e constatou que a incorporação de unidades 3-hidroxi-3-butanóico à cadeia polimérica permitia modular as propriedades físicas e mecânicas do polímero produzido, ampliando suas possíveis aplicações (SILVA et al., 2001).

### 3.2.1 Propriedades e Características dos PHAs

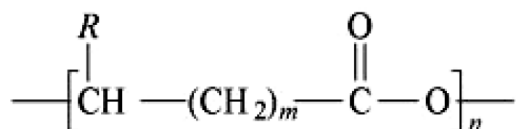
Diferentes unidades monoméricas têm sido identificadas como constituintes dos PHAs, fazendo com que diferentes tipos de polímeros sejam sintetizados e aumentando a gama de utilizações deste material (SCHMIDT, 2011). Na Figura 3, é possível observar a estrutura geral dos PHAs, em que o alcano substituído na posição “R” determina as propriedades do polímero formado. Quando um metil é substituído na posição “R”, tem-se o poli(3-hidroxi-3-butanóico) ou [P(3HB)].

O PHB foi o primeiro PHA a ser descoberto, sendo, portanto, o mais bem estudado e conhecido. Caracteriza-se por ser frágil, possuir pouca elasticidade e alto grau de cristalinidade (SUDESH et al., 2000), com temperatura de fusão perto de 180 °C (LOCATELLI, 2012). Algumas das propriedades físicas do PHB e seus copolímeros, como o PHBV, podem ser comparados ao polipropileno e ao polietileno de alta densidade como se observa na Tabela 2.

Entre os diversos polímeros biodegradáveis em desenvolvimento, os PHAs têm atraído à atenção graças às propriedades semelhantes com os termoplásticos convencionais, o que é devido a esta ampla diversidade química dos seus radicais (POLI et al., 2011). Esses polímeros podem variar desde termoplásticos rígidos e quebradiços, até macios, elastômeros, borrachas e colas, dependendo de sua composição monomérica (LOCATELLI, 2012). Alguns

### Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

filmes de PHAs apresentam propriedades de barreira a gás comparáveis ao poli(cloreto de vinila) e ao poli(tereftalato de etileno), com a vantagem de serem biodegradáveis (QUILLAGUAMÁN et al. 2010; LOCATELLI, 2012).



R grupo alquila C<sub>1</sub>-C<sub>13</sub>

n varia de 100 a 35000 unidades.

<b>m = 1:</b>	R = hidrogênio;	Poli(3-hidroxiopropionato)
	R = metil;	Poli(3-hidroxiбутирато) [P(3HB)]
	R = etil;	Poli(3-hidroxi valerato)
	R = propil;	Poli(3-hidroxi hexanoato)
	R = nonil;	Poli(3-hidroxi dodecanoato)
<b>m = 2:</b>	R = hidrogênio;	Poli(4-hidroxi бутирато)
	R = metil;	Poli(4-hidroxi valerato) [P(4HV)]
<b>m = 3:</b>	R = hidrogênio;	Poli(5-hidroxi valerato)
	R = metil;	Poli(5-hidroxi hexanoato) [P(5HHx)]
<b>m = 4:</b>	R = hexil;	Poli(6-hidroxi dodecanoato)
<b>m = 9:</b>	R = hidroxila;	Poli(11-hidroxi hexadecanoato) [P(11HHD)]
<b>m = 12:</b>	R = hidrogênio;	Poli(3-hidroxi tetradecanoato) [P(3HTD)]
<b>m = 13:</b>	R = hidroxila;	Poli(15-hidroxi pentadecanoato) [P(15HPD)]

**Figura 3.** Estrutura molecular geral dos polihidroxiálcanoatos (PHAs), com m = 1 a 13, porém 1 sendo mais comum, n variando de 100 a milhares de unidades e R variável (BRITO et al., 2011).

### Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

**Tabela 2.** Comparação entre as principais características do P(3HB), PHBV, PP e do PEAD.

Características	[P(3HB)]	PHBV (5 a 20 % HV)	(PP)	(PEAD)
Temperatura de fusão (°C)	180	172 – 150	174	125 – 132
Temperatura de transição vítrea (°C)	5	9	-17	-70
Densidade (g.cm <sup>-3</sup> )	1,18 – 1,25	1,2	0,91	0,95 – 0,96
Grau de cristalinidade (%)	60 – 80	30 – 40	68	60 – 80
Módulo de elasticidade (Módulo de Young) (MPa)	3500	2500 – 1500	1700	1000
Tensão de cisalhamento (MPa)	40	35 – 25	38	20 – 36
Resistência à ruptura (%)	6	35 – 8	400	12
Massa molar ponderal média (x10 <sup>5</sup> Da)	5	3	2	2– 6

**Fonte:** FORMOLO et al. (2003) e COUTINHO et al. (2003).

[P(3HB)] – poli(3-hidroxi-butirato); PHBV – poli(hidroxi-valerato); PP – polietileno; PEAD – polietileno de alta densidade.

De forma geral, o [P(3HB)] apresenta propriedade de biocompatibilidade, biodegradabilidade, alto grau de polimerização, é atóxico, opticamente ativo e piezoelétrico (as moléculas do polímero são organizadas em hélices sem centros simétricos) (SCHMIDT, 2011). No entanto, as propriedades físicas e mecânicas restringem seu aspecto de aplicação na área de embalagens, sendo um material rígido e quebradiço, caracterizado pela baixa deformação (6 % no [P(3HB)]), enquanto no PP é de 400 %), conseqüentemente, dificultando seu processamento e aplicação (VANZIN, 2008; LAYCOCK et al., 2013). A fim de melhorar essas características e expandir suas aplicações, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos buscando descobrir novas combinações de monômeros que melhorem as suas características termoplásticas (LOCATELLI, 2012).

No que concerne à massa molecular dos PHAs, esta propriedade depende das condições de produção e recuperação destes biopolímeros. Os mecanismos que influenciam e determinam a massa molecular dos PHAs em células bacterianas ainda não são completamente entendidos, entretanto, geralmente se atribui, principalmente, ao tipo de micro-organismo e a fonte de carbono utilizada na síntese destes bioplásticos (GARCÍA Y.G. et al., 2013).

Os PHAs podem ser classificados em três grupos, dependendo do número de átomos de carbono que constituem a cadeia lateral. Geralmente variam entre C<sub>1</sub>-C<sub>16</sub> (SURIYAMONGKOL et al., 2007). Deste modo, os monômeros constituintes de PHA classificam-se em: (i) aqueles de cadeia curta (PHA<sub>SCL</sub> – “HydroxyAcids of Short-Chain-Length”), contendo de 3 a 5 átomos de carbono na cadeia principal, (ii) aqueles de cadeia

### *Capítulo 3 – Revisão bibliográfica*

média (PHA<sub>MCL</sub> – “HydroxyAcids of Médium-Chain-Length”), contendo de 6 a 16 átomos de carbono na cadeia principal, e (iii) aqueles de cadeia longa (PHA<sub>LCL</sub> – “HydroxyAcids of Long-Chain-Length”), contendo mais de 16 átomos de carbono na cadeia principal (CARDOZO, 2013).

#### **3.2.2 Aplicações**

Os PHAs apresentam características termoplásticas e outras propriedades físicas e mecânicas bastante variáveis a depender da composição e massa molecular (Tabela 2 e Figura 3). Isto os torna candidatos para várias aplicações na indústria de embalagens, médica, farmacêutica, agrícola e alimentícia, ou como matérias-primas para a síntese de produtos químicos, enantiomericamente, puros para a produção de tintas (BABEL & STEINBÜCHEL, 2001). No caso de [P(3HB)], que é um termoplástico com propriedades semelhantes às do polipropileno, aplica-se em materiais de embalagem, produtos higiênicos, agrícolas e biomédicos (GARCÍA Y.G. et al., 2013).

A aplicação mais conhecida destes biopolímeros de cadeia curta é para fim de fabrico de garrafas descartáveis para shampoos, recipientes para produtos alimentares, sacolas e outros produtos descartáveis tais como fraldas, guardanapos, lâminas de barbear, copos e talheres (BRITO et al., 2011).

No que diz respeito às aplicações biomédicas, estes se baseiam na propriedade de serem biocompatíveis com o tecido humano e reabsorvidos numa baixa velocidade. Deste modo, tais biopoliésteres têm sido utilizados como fio de sutura, substitutos de sistemas de distribuição de pericárdio e drogas. Em aplicações biomédicas, utilizam-se como material para a osteossíntese ou fixação, estimulando a formação do osso, bem como a utilização de seus produtos de hidrólise como matéria-prima para a indústria farmacêutica em que são necessárias moléculas específicas (GARCÍA Y.G. et al., 2013).

Outra aplicação destes biopoliésteres é relacionada à área de alimentos, especificamente como embalagens para queijos, onde são comumente, utilizados, materiais não biodegradáveis à base de acetato de polivinila (BABEL & STEINBÜCHEL, 2001). Em geral, por causa da sua biodegradabilidade, a impermeabilidade à água e ao oxigênio, os PHAs podem ser usados para todos os tipos de materiais biodegradáveis. Estima-se, também, que a sua utilização em artigos médicos descartáveis seja economicamente viável.



### *Capítulo 3 – Revisão bibliográfica*

Tecnicamente, as perspectivas para uma maior utilização do PHA são muito promissoras, desde que o preço desses materiais seja reduzido. Deste modo, estratégias tecnológicas estão sendo estudadas, a fim de produzir PHAs a partir de plantas como milho e batatas, e com tecnologias de menor custo de produção, para a utilização no fabrico de diversos produtos. Neste contexto, busca-se estudar e monitorar estirpes microbianas capazes de produzir PHA, utilizando resíduos industriais como fontes principais de carbono (GARCÍA Y.G. et al., 2013).

#### **3.2.3 Biodegradabilidade**

A degradação microbiológica – biodegradação – é o processo de degradação de um polímero que resulta da ação de micro-organismos, tais como bactérias ou fungos, em ambientes aeróbicos ou anaeróbicos (BRUNEL, 2008). Uma importante característica dos PHAs é, justamente, a sua biodegradabilidade. Na natureza, vários micro-organismos são hábeis para degradar PHAs pelo uso de PHA hidrolases e PHA despolimerases. As atividades destas enzimas podem variar e dependem da composição do polímero, sua forma física (amorfa ou cristalina), as dimensões das amostras e das condições ambientais (FONSECA, 2003).

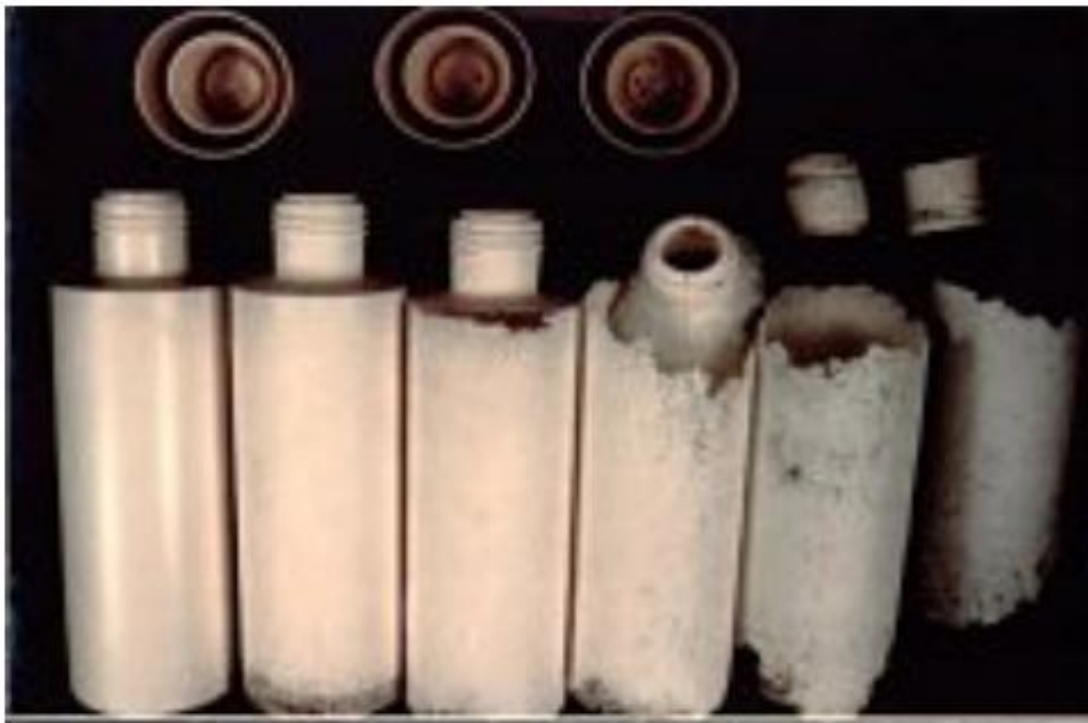
[P(3HB)] e outros PHAs podem ser completamente degradados a dióxido de carbono e água (e metano sob condições anaeróbicas) pelos micro-organismos no ambiente, sendo facilmente degradado no solo (GARCÍA Y.G. et al., 2013). A degradação enzimática de [P(3HB)] é afetada por sua estereocomposição e tacticidade (FONSECA, 2003). A Figura 4 apresenta a degradação de um frasco de [P(3HB-co-HV)] em lodo de tratamento de efluentes. O progresso de degradação é demonstrado com os frascos após 0, 2, 4, 6, 8 e 10 semanas (da esquerda para direita).

O tempo de degradação do produto formado por [P(3HB)] é da ordem de poucos meses (digestão anaeróbica) a anos (água do mar) (BRITO et al., 2011). A velocidade de biodegradação destes biopoliésteres depende de vários fatores, incluindo a área superficial do biopolímero, atividade microbiana, pH, temperatura, umidade e a presença de outros nutrientes (GARCÍA Y.G. et al., 2013).

A biodegradação dos polímeros ocorre por dois mecanismos distintos, dependendo da natureza do polímero e do ambiente. O primeiro é a hidrólise biótica ou abiótica seguida por

### Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

bioassimilação (hidrobiodegradação), que é o processo primário envolvido na biodegradação das heterocadeias poliméricas tais como celulose, amido e poliésteres alifáticos, dos quais polímeros de ácido lático (PLA) e polihidroxicanoatos são típicos. O segundo é a peroxidação seguida por bioassimilação de produtos de baixa massa molecular (oxobiodegradação), que é aplicada, particularmente, à cadeia de carbono dos polímeros (SCOTT, 2000).



**Figura 4.** Degradação de embalagem de [P(3HB-co-HV)] em lodo de tratamento de efluentes (CARMINATTI et al., 2006).

A Figura 5 representa o biociclo completo de produção e degradação de PHAs. Neste ciclo através da fotossíntese, as plantas utilizam a luz solar, dióxido de carbono e água para produzir carboidratos. Estes na forma de açúcares simples podem ser utilizados como fontes de carbono em um processo de cultivo com micro-organismos específicos produzindo PHA que será purificado e processado formando os mais diversos artigos plásticos. Após seu uso, os PHAs podem ser depositados em ambientes microbianos ativos e a biodegradação deste polímero formará dióxido de carbono e água. Uma rota direta através de plantas que produzem PHAs pode ser representada (CATONI, 2011).

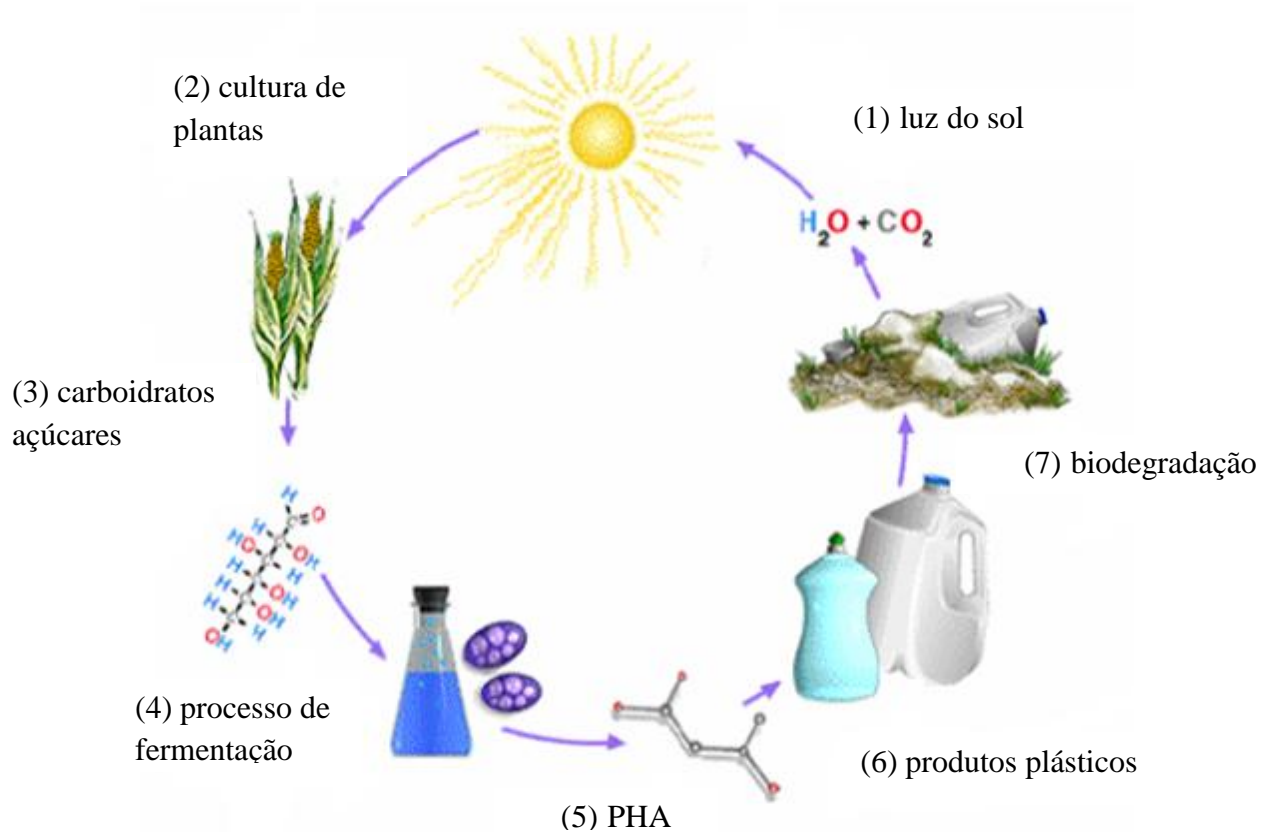
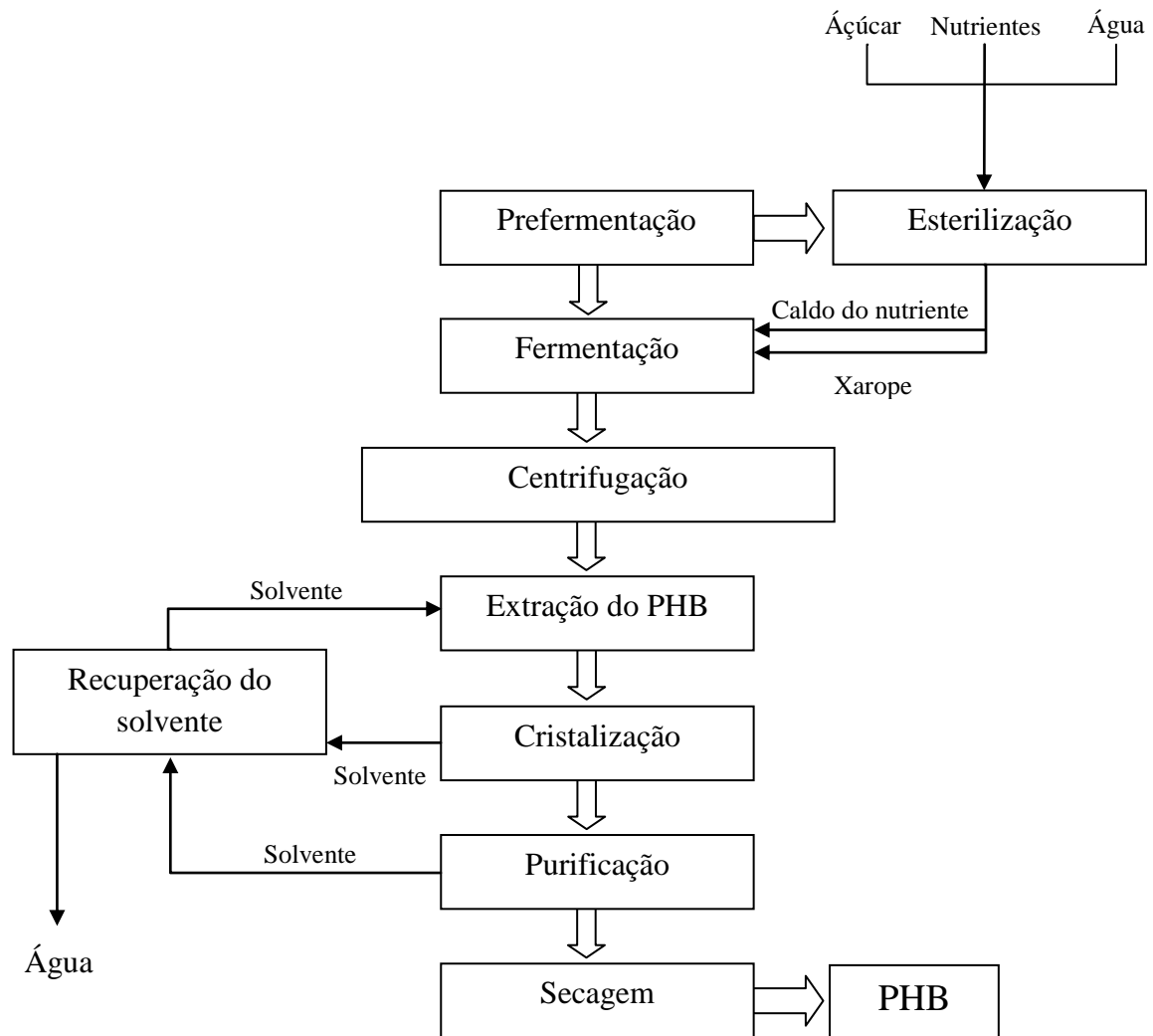


Figura 5. Ciclo fechado de produção de polihidroxialcanoato (PHA) (DALCANTON, 2006).

### 3.2.4 Produção de PHAs

A fermentação bacteriana é a principal forma de produção do [P(3HB)] (BRUNEL, 2008). O processo constitui-se, basicamente, de duas etapas: a primeira etapa fermentativa, na qual o micro-organismo é cultivado em reatores com ácido butírico, frutose ou outra fonte de carbono, em que ocorre a metabolização do açúcar disponível e o acúmulo o [P(3HB)] no interior da célula como fonte de reserva de energia; a segunda etapa, na qual a parede celular bacteriana precisa ser rompida para a extração do polímero, e este é removido e purificado por meio de processos convencionais como centrifugação, filtração ou floculação-centrifugação com solventes adequados como hidrocarbonetos clorados, cloreto de metila, clorofórmio e diclorometano até a obtenção do produto final sólido e seco (BRUNEL, 2008), conforme fluxograma (Figura 6).

### Capítulo 3 – Revisão bibliográfica



**Figura 6.** Fluxograma do processo de obtenção de PHB (BIOCYCLE, 2012).

#### 3.2.4.1 Micro-organismos Produtores

Segundo Locatelli (2012), são conhecidas mais de 250 espécies de micro-organismos capazes de acumular PHAs, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas. Entre elas se incluem bactérias heterotróficas aeróbicas e anaeróbicas, como: *Azotobacter beijerinckii*, *Zoogloea ramigera*, *Burkholderia cepacia* e *Bacillus megaterium*; fototróficas aeróbicas e anaeróbicas, como: *Chlorogloea fritschii*, *Rhodospirillum rubrum* e *Chromatium okenii*; quimiolitotróficas, como *Cupriavidus necator* (GLAZER & NIKAIDO, 2007). Também são produzidos por algumas eubactérias, membros da família *Halobacteriaceae* pertencente ao domínio *Archaea*, entre os gêneros *Haloferax*, *Haloarcula*, *Natrialba*, *Haloterrigena*,

### Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

*Halococcus*, entre outros (REHM & STEINBÜCHEL, 1999; POLI et al., 2011; LOCATELLI, 2012).

Apesar da existência de inúmeros micro-organismos capazes de produzir e acumular PHAs, somente os que acumulam mais de 20 % de polímero por massa seca de célula são selecionados para a produção industrial (LENZ & MARCHESSAULT, 2005). Desta forma, a seleção do micro-organismo deve levar em consideração o crescimento em fontes de carbono de baixo custo, além da capacidade de produção em escala industrial, nível de segurança do micro-organismo, facilidade de extração do polímero, produção em alta densidade celular e acúmulo em percentagens elevadas de PHAs em relação a sua massa seca (LOCATELLI, 2012). Entre os micro-organismos produtores, as bactérias mais empregadas e estudadas são: *Cupriavidus necator*, *Alcaligenis latus*, *Az. Vinelandii*, *Bacillus megaterium*, *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas extorquens* (ROCHA JÚNIOR, 2005). A produção e os percentuais de PHA acumulados por vários micro-organismos, cultivados em diferentes sistemas de cultivo, a partir de diversas fontes de carbono, pode ser observado na Tabela 3.

**Tabela 3.** Produção de PHA ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e o percentual de extração (%), a partir de diversas fontes principais de carbono e cepas microbianas.

Micro-organismo	Fonte principal de carbono	PHA		Referência
		( $\text{g.L}^{-1}$ )	(%)	
<i>Alcaligenes latus</i> ATCC 29714	Sacarose	4,0	36,7	WANG et al. (2013)
<i>Comamonas</i> sp. EB 172	Ácido lático	3,0	66,0	ZACARIA (2010)
<i>Bacillus cereus</i> EGU3	Glicose	0,5	66,6	PORWAL et al. (2008)
<i>Bacillus megaterium</i>	Glicose	4,2	59,1	NARANJO et al. (2013)
<i>Bacillus megaterium</i>	Glicerina bruta	4,8	62,4	NARANJO et al. (2013)
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 17759	Glicerina bruta	7,4	57,3	ZHU et al. (2012)
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 17759	Ácido valérico	8,7	51,4	PAN et al. (2012)
<i>Escherichia coli</i> recombinante	Glicose	89,0	76,0	ROCHA JÚNIOR (2005)
<i>Cupriavidus necator</i> IPT 026	Glicerina bruta	2,81	65,0	CAMPOS et al. (2013)
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Glicerina bruta	9,7	25,9	CAVALHEIRO et al. (2012)
<i>Cupriavidus necator</i>	Hidrolisado de mandioca	61,9	57,5	KEENAN et al. (2006)
<i>Cupriavidus necator</i> JMP 134	Glicerina bruta	20,0	70,0	MOTHES et al. (2007)
<i>Pseudomonas extoquens</i>	Metanol	136,0	61,0	ROCHA JÚNIOR (2005)
<i>Pseudomonas oleovorans</i> M26	Glicose	3,3	31,4	HUANG et al. (2006)
<i>Pseudomonas</i> sp. LDC-5.	Sacarose	2,5	65,1	SARANYA & SHENBAGARATHAI (2011)

### *Capítulo 3 – Revisão bibliográfica*

De qualquer forma, é importante desenvolver uma estratégia adequada de fermentação para cada um desses micro-organismos, a fim de conseguir alta produtividade de PHA. Para a cultura de bactérias que acumulam PHA sob condição limitante de nutriente, o método de cultura em batelada em duas etapas tem sido largamente empregado. Para os produtores de PHA associados ao crescimento, utiliza-se a estratégia de fornecimento otimizado de nutrientes, a qual atende tanto à fase de crescimento celular quanto à fase de acúmulo de PHA (FORMOLO et al., 2003).

É desejável que as cepas tenham velocidade específica de crescimento e de produção de PHA elevados, que possam utilizar fontes de carbono de baixo custo, apresentem uma porcentagem elevada de polímero em relação à massa total seca e, finalmente, é importante que haja um fator de conversão de fonte de carbono em polímero bastante elevado (GARCÍA I.L. et al., 2013).

#### **3.2.4.1.1 *Cupriavidus necator***

Desde a descoberta de bactérias produtoras de PHAs por Lemoigne em 1926, *Cupriavidus necator* tem sido a bactéria mais estudada e a maior produtora desses polímeros (HIROE et al., 2013). Antes de ser classificada com esse nome, ela foi descrita como *Hydrogenomonas eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha* e *Wautersia eutropha* (BRITO et al., 2011). Essas mudanças na classificação devem-se à incorporação de testes genéticos (comparação do rRNA 16S e hibridização) nas chaves taxonômicas (LAYCOCK et al., 2013).

*Cupriavidus necator* é um micro-organismo procariótico, do tipo gram-negativo, encontrado naturalmente no solo e água. Essa espécie possui células na forma de bastonete, é móvel, tendo de 1 a 4 flagelos peritríquios. As células podem tornar-se esféricas na fase estacionária de crescimento (MARANGONI, 2000; BRITO et al., 2011). Suas principais características bioquímicas são: não formação de ácido a partir de carboidratos, a produção de urease, possui mobilidade (flagelos peritríquios), capacidade de reduzir nitrato, presença das enzimas catalase e oxidase e capacidade de hidrolisar Tween 80 (VANEECHOUTTE et al., 2004).

Os PHAs sintetizados por *Cupriavidus necator* contêm monômeros de 3-hidroxicvalerato (3HV), 3-hidroxi butirato (3HB), 4-hidroxi butirato (4HB), 5-hidroxicvalerato

### **Capítulo 3 – Revisão bibliográfica**

(5HV) quando ácido valérico ou propiônico são fornecidos (BEREZINA, 2013). É o micro-organismo de maior interesse para a produção industrial. O acúmulo de polímero pelo micro-organismo pode ser superior a 80 % de sua massa celular em [P(3HB)] com alta massa molecular, utilizando-se diferentes tipos de fontes de carbono (TSUGE et al., 2007), como glicose ou frutose, soro de leite fermentado e os açúcares invertidos de cana-de-açúcar (FORMOLO et al., 2003).

*Cupriavidus necator* desenvolve-se autotroficamente em atmosfera de gases H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> ou em condições de quimiolitotrofia ou heterotrofia (BRITO et al., 2011). A quimiolitotrofia é a capacidade de os micro-organismos utilizarem os compostos inorgânicos como doadores de elétrons e o dióxido de carbono como fonte de carbono. A heterotrofia é a capacidade de utilizar compostos orgânicos como fonte de carbono e energia (LAYCOCK et al., 2013).

#### **3.2.4.1.2 Bactérias do gênero *Burkholderia***

O gênero *Burkholderia* também vem sendo pesquisado para produção de PHAs. Este micro-organismo é encontrado no solo e é capaz de acumular PHAs contendo unidades de 3HB, a partir de fontes simples de carbono como sacarose ou gluconato (RODRIGUES et al., 2000). Uma das linhagens isoladas, a *Burkholderia sacchari* IPT 101 apresenta boa produção do copolímero P(3HB-co-3HV). Entretanto, assim como a maioria dos micro-organismos produtores de PHAs, tem baixa conversão de ácido propiônico em unidades 3HV (GARCIA, 2006). Há também linhagens de *Burkholderia sacchari* capazes de acumular [P(3HB)], a partir de hidrolisado de bagaço de cana, resíduo da indústria sucroalcooleira (VIVEIROS, 2002).

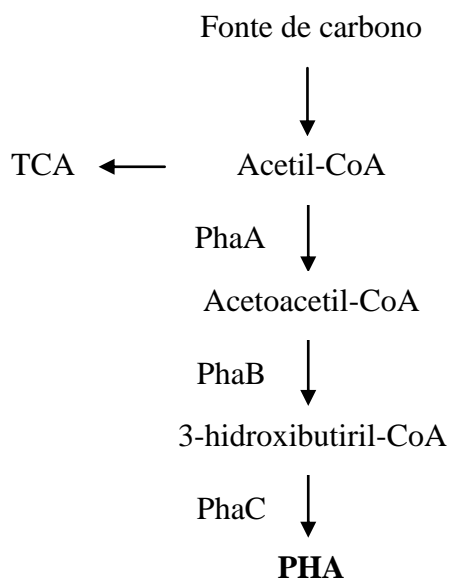
*Burkholderia cepacia* é uma bactéria gram-negativa capaz de produzir PHAs de cadeia curta, incluindo polihidroxibutirato, bem como copolímeros de PHB e polihidroxivalerato (PHV), quando cultivada com os precursores de monômeros tais como o ácido levulínico, que também inibe o crescimento das células em concentrações elevadas (CAULKINS, 2008). Enquanto isso, estes micro-organismos são amplamente utilizados como agentes de biorremediação, devido à sua capacidade para degradar compostos tóxicos como os hidrocarbonetos poliaromáticos bifenilos policlorados, furanos e monômeros de lignina (PAN et al., 2012).

## Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

### 3.2.4.2 Biossíntese de PHAs

Uma série de organismos vem sendo estudada para elucidar as possíveis rotas de biossíntese de PHAs, sendo a única rota totalmente descrita, tanto bioquímica quanto geneticamente, independente das fontes de carbono empregadas, as vias de síntese e despolimerização de *Cupriavidus necator*, que são muito semelhantes às encontradas em outros gêneros de bactérias (LÜTKE-EVERSLOH & STEINBÜCHEL, 2004; ROCHA JÚNIOR, 2005). A via metabólica de biossíntese dos PHAs está relacionada tanto à síntese de ácidos graxos para formação de fosfolipídios e outros lipídios importantes à fisiologia e bioquímica das células bacterianas, quanto a produtos do metabolismo secundário, como a produção de ramnolipídios em *P. aeruginosa* quando crescida em hexadecano como fonte de carbono e energia (ROCHA JÚNIOR, 2005).

Segundo Takahashi (2012), na maior parte dos micro-organismos estudados para a síntese de PHA, a biossíntese do [P(3HB)] ocorre a partir do acetil coenzima-A (acetil-CoA) através de três reações catalisadas por enzimas diferentes (Figura 7).



**Figura 7.** Rotas metabólicas envolvidas na biossíntese de PHAs. PhaA,  $\beta$ -cetotiolase; PhaB, acetoacetil-CoA redutase NADPH-dependente; PhaC, PHA sintase (TAKAHASHI, 2012).

A primeira reação consiste na condensação de duas moléculas de acetil coenzima-A para acetoacetil-CoA por meio da enzima  $\beta$ -cetotiolase (PhaA). O mecanismo enzimático da



## *Capítulo 3 – Revisão bibliográfica*

$\beta$ -cetotiolase consiste de duas reações parciais. Na primeira reação, a cisteína responsável pelo sítio ativo da enzima tem a função de ligar a primeira molécula de acetil-CoA à enzima, em seguida ocorre a ativação da segunda molécula de acetil-CoA, possibilitando a condensação e formação do acetoacetil-CoA. (TAKAHASHI, 2012). Na segunda reação, a redução do acetoacetil-CoA para hidroxibutiril-CoA ocorre numa reação estereoespecífica promovida pela enzima acetoacetil-CoA redutase NADPH-dependente (PhaB) (SUDESH et al., 2000). Na terceira reação, os monômeros de hidroxibutiril-CoA são polimerizados em [P(3HB)] pela PHA sintase (PhaC), formando os PHAs (VANZIN, 2008). A PHA sintase é uma enzima chave para a biossíntese de PHA, uma vez que catalisa a reação decisiva (polimerização de unidades), e também a sua especificidade pela fonte principal de carbono determinará a composição do PHA (MADISON & HUISMAN, 1999). É uma enzima estereoespecífica para os estereoisômeros R, e apresenta um amplo espectro de especificidade de substrato, portanto uma grande variedade de monômeros podem ser polimerizados (TAKAHASHI, 2012).

### **3.3 Glicerol e Glicerina**

#### **3.3.1 Características e Propriedades**

O glicerol é um composto orgânico, líquido à temperatura ambiente e pertencente à função álcool. Ele está presente nas células vivas, onde se combina com os ácidos graxos presentes na maioria dos óleos e gorduras de animais e vegetais para formar os triglicerídeos. Ele é um componente natural de vinhos, cervejas, pães e outros produtos da fermentação de grãos e açúcares. Portanto, o glicerol pode ser extraído de óleos vegetais e gordura animal (SCHMAEDECKE, 2010).

O termo glicerol aplica-se somente ao componente químico puro 1,2,3-propanotriol ou ao teor de anidro presente em um produto de glicerina ou em uma formulação (SCHMAEDECKE, 2010). O termo glicerina aplica-se aos produtos comerciais purificados, normalmente, contendo pelo menos 95 % de glicerol. Vários níveis e designações de glicerina estão disponíveis comercialmente. Eles diferem um pouco em seu conteúdo de glicerol e em outras características, tais como cor, odor e impurezas (MOTA et al., 2009).

A glicerina é um coproduto das indústrias baseadas em oleoquímica e é produzida por

### *Capítulo 3 – Revisão bibliográfica*

via química ou fermentativa. Desde 1950, este coproduto é bastante produzido, pois é subproduto do propileno, porém, sua oferta tem aumentado significativamente desde a década de 90 devido à fabricação do biodiesel (SCHMAEDECKE, 2010). Com a produção do biodiesel seu preço caiu 50 % (MENEGUETTI, 2006; GLICERINA, 2010). A glicerina pode ser obtida também pela saponificação, hidrólise ou transesterificação de óleos e gorduras, e posterior purificação por destilação ou troca iônica (SCHMAEDECKE, 2010).

A glicerina destilada, após separada do processo produtivo, apresenta-se como um líquido oleoso, incolor, viscoso, solúvel em água e álcool, e insolúvel em hidrocarbonetos, é pouco solúvel em éter, acetato de etila e dioxano. É, ainda, higroscópico, e apresenta risco de explosão, quando em contato com agentes oxidantes (FERREIRA, 2009).

#### **3.3.2 Aplicações da Glicerina**

Devido à combinação de propriedades químicas e físicas, a glicerina possui mais de 1500 aplicações conhecidas. Ela é de fácil manuseio, compatível com diversas outras substâncias, estável em uma ampla faixa de temperatura e pressão e não tóxico para a saúde humana e para o meio ambiente (SCHMAEDECKE, 2010). Suas principais aplicações são na síntese de resinas e nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de alimentos. Porém, se buscam novas aplicações para o excedente de glicerina gerado (GLICERINA, 2010).

Na indústria farmacêutica, a glicerina é utilizada como solvente, umectante em cremes para a pele, loções pós-barba e maquiagens. Nas indústrias de alimentos, ela é utilizada para conservar bebidas e alimentos, além de substituir o sorbitol na grande maioria de suas aplicações nos alimentos, tais como solvente para aromas e corantes (GLICERINA, 2010).

A glicerina não cristaliza a baixas temperaturas, e por isso é utilizada em soluções anti-congelantes. Essa propriedade ajuda a manter a vida de prateleira dos produtos, pois os protege durante o armazenamento e estocagem. Devido a sua viscosidade, ela é um bom agente de corpo. Devido a sua higroscopicidade e baixa pressão de vapor (ela não volatiliza em temperaturas entre 0 °C e 70 °C), ela é umectante e maleável, gerando produtos suaves, cremosos e flexíveis (SCHMAEDECKE, 2010).

A glicerina residual contém elementos nutricionais, como lipídios, fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio, que são factíveis de serem utilizados por micro-organismos para o seu crescimento durante processos de cultivo (THOMPSON & HE, 2006;

### *Capítulo 3 – Revisão bibliográfica*

SILVA & OLIVEIRA et al., 2013). Desse modo, existem bioprodutos obtidos por fermentação microbiana do glicerol, tais como o 1,3-propanodiol, utilizado na produção de polímeros, tintas, resinas de poliésteres, lubrificantes, anti-congelantes e cosméticos. Outros exemplos são etanol, hidrogênio, ácido cítrico, ácido succínico, polihidroxialcanoatos, ácido graxo poliinsaturado ômega 3, dihidroxiacetona, biosurfactantes, corantes naturais e ácido clavulânico, este último utilizado contra infecções bacterianas (RIVALDI et al., 2008; SCHMAEDECKE, 2010). Entretanto, estratégias mais detalhadas para a utilização biotecnológica da glicerina são esperadas em poucos anos, de forma a reduzir os impactos ambientais e tornar o biodiesel um produto altamente competitivo no mercado mundial de combustíveis (RIVALDI et al., 2007, 2008; SCHMAEDECKE, 2010).

#### **3.3.3 Glicerina Residual do Biodiesel**

Biodiesel é o nome dado a ésteres alquílicos de ácidos graxos desde que atendam certos parâmetros de qualidade. Além de esses ésteres serem derivados de fontes biológicas como plantas e animais, atuam como combustível substituto do diesel de petróleo, com desempenho muito próximo, não exigindo modificação nos motores de automóveis (DABDOUB et al., 2009).

O biodiesel é um combustível biodegradável que pode ser utilizado puro ou em misturas com óleo diesel, em diferentes proporções. Ele pode ser obtido por craqueamento, esterificação ou transesterificação. O principal processo de produção é a transesterificação (Figura 8), em que óleos ou gorduras reagem com metanol ou etanol sobre ação de um catalisador ácido, básico ou enzimático. O resultado desta reação é a produção de biodiesel, que são ésteres graxos metílicos ou etílicos e glicerina, sendo que para cada litro de biodiesel da transesterificação são gerados 100 mililitros de glicerina (MOTA, 2010; SCHMAEDECKE, 2010).

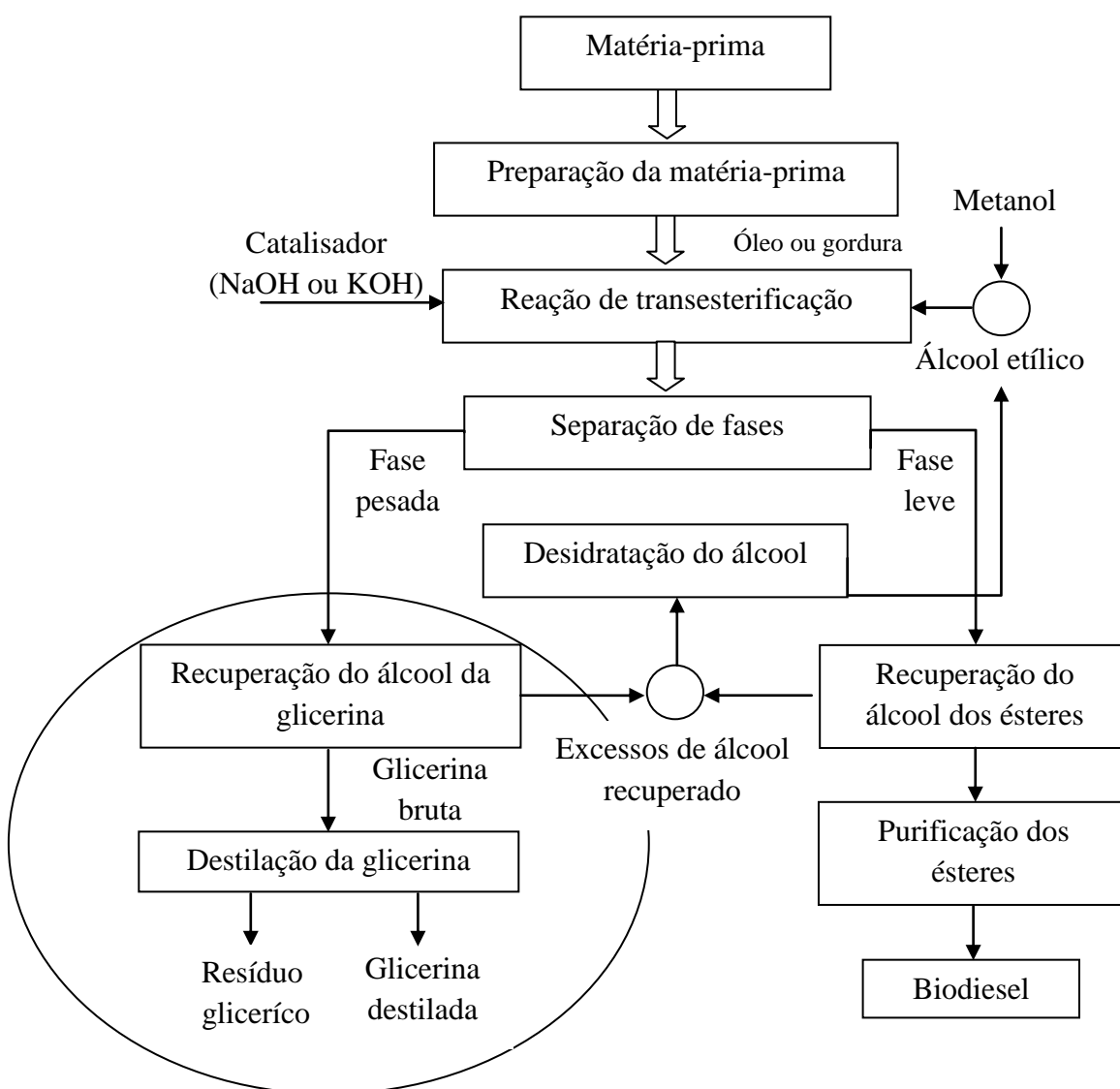
A qualidade (características físico-químicas) do biodiesel e da glicerina depende da composição química do óleo ou gordura utilizado como partida e do tipo de catálise empregada. Para diminuir o teor de impurezas de glicerina, esta deve ser submetida à destilação, mas sob custo elevado (SCHMAEDECKE, 2010).

No Brasil, a produção de biodiesel vem aumentando consideravelmente e a quantidade de glicerina residual gerada encontra-se em crescimento vertiginoso, o quê acaba

### Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

representando um possível problema, onde a busca de novas soluções para sua utilização é de fundamental importância (FRIEDRICH, 2004; BIODIESELBRASIL, 2007).

A maioria das plantas industriais de biodiesel, no Brasil, não valoriza efetivamente a glicerina. A projeção do volume de glicerina no país para o ano 2010 foi de 330 milhões de reais e as perspectivas, nesse sentido, para 2020 são muito animadoras (LEMOS et al., 2008). Nos Estados Unidos, o valor da glicerina diminuiu de 1048 R\$/ton em 2004 para aproximadamente 125 R\$/ton no ano 2006 (YAZDANI & GONZÁLEZ, 2007).



**Figura 8.** Processo de produção de biodiesel e recuperação de álcool da glicerina (MENDES & SERRA, 2012).

### **Capítulo 3 – Revisão bibliográfica**

No Brasil, o preço da glicerina residual varia de 200 a 400 R\$/ton, sendo o valor da glicerina loira (glicerina parcialmente tratada para remoção de impurezas) de 600 a 800 R\$/ton. Considerando a real situação e as possíveis projeções para os próximos anos, a utilização da glicerina como fonte principal de carbono para os micro-organismos poderá torna-se extremamente vantajosa em relação ao preço, quando comparado a outros resíduos tradicionalmente utilizados para a obtenção de bioprodutos (BIODIESELBRASIL, 2007; MELO, 2011).

A glicerina residual, oriunda do biodiesel, contém quantidades variáveis de sabão, álcool (metanol ou etanol), monoacilglicerol, diacilglicerol, oligômeros de glicerol, polímeros e água (CHÁVEZ, 2008). Além disso, este coproduto pode ser utilizado sem qualquer purificação, já que a alcalinidade decorrente da solubilização do catalisador de transesterificação ajuda na formação do alcóxido de glicerina, aumentando a reatividade (MOTA et al., 2009).

A porcentagem de glicerina residual no biodiesel pode variar entre 40 a 70 % (p/p). Dessa forma, o aspecto desta glicerina encontra-se intimamente relacionado ao conteúdo de sabão e dos sais precipitados durante o processo de tratamento, que proporciona aparência de viscoso e escuro (THOMPSON & HE, 2006). As características físicas, químicas e nutricionais da glicerina residual dependem do tipo de ácido graxo e do tipo de catálise empregada na produção de biodiesel (MELO, 2011).

#### **3.3.4 Conversão Microbiológica da Glicerina**

A glicerina é considerada uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbicas e anaeróbicas (GANCEDO et al., 2001), sendo um dos poucos substratos capazes de atravessar a membrana celular por difusão facilitada nas células procarióticas (MELO, 2011).

Em bactérias como *Escherichia coli*, a proteína do tipo poro-canal-G1Pf atua por sensibilidade mecânica sem gasto energético na presença de glicerina. Este facilitador permite a assimilação, além de glicerina, de pequenas moléculas de polihidroxiálcoóis, uréia e glicina, mas exclui moléculas carregadas com gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato (CHÁVEZ, 2008).

### 3.4 Técnicas de Caracterização de Polímeros

#### 3.4.1 Métodos Espectroscópicos (Infravermelho)

O termo “espectroscopia” especifica a medida da intensidade de absorção ou emissão de radiação eletromagnética, por uma amostra polimérica a ser analisada. Como por exemplo, a absorção do ultravioleta visível (UV visível) que atravessa um polímero: diferentes porções do espectro de radiação eletromagnética são absorvidos em diferentes graus dependendo da estrutura molecular da amostra. As medidas de absorção de comprimento de onda podem ser interpretados em termos de estrutura molecular (CAMPBELL & WHITE, 1989; GARCIA, 2006).

O espectro de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é um dos métodos mais rápidos para caracterizar os grupos funcionais de um composto químico. O método se aplica tanto à análise qualitativa quanto à quantitativa, de sólidos, líquidos ou gases. As quantidades de analito usadas são muito pequenas (da ordem de miligramas ou fração); a amostra não é destruída no ensaio, caso seja analisada por ATR (reflectância total atenuada) e pode, portanto, ser recuperada após a medida do espectro, contudo se a amostra for diluída em KBr não pode ser recuperada (CATONI, 2011).

As características mais importantes de um espectro no infravermelho são os valores das frequências de absorção da molécula (bandas), parâmetro fundamental para sua identificação ou para a interpretação do espectro, visando a caracterização de grupos funcionais nele presentes. O espectro de uma mistura será como uma mistura dos espectros dos compostos em separados (SPIER, 2005 *apud* CATONI, 2011). Na Tabela 4 podem ser observadas as bandas características para o [P(3HB)] no espectro de infravermelho.

**Tabela 4.** Bandas características no espectro de infravermelho para o [P(3HB)].

Atribuição das bandas	[P(3HB)] (cm <sup>-1</sup> )
Deformação axial da ligação C = O	1735 - 1721
Deformação axial da ligação C – C	978
Estiramento da ligação C – H	2972 - 2850
Estiramento assimétrico e simétrico do grupo C – O – C	1272 e 1058
Deformação angular simétrica no plano dos grupos CH <sub>3</sub> (metil)	1380

Fonte: BARUD et al. (2011).

## Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

### 3.4.2 Análise de Difração de Raios-X (DRX)

O DRX é um método tradicional para determinação da estrutura cristalográfica em polímeros cristalinos. É o método mais simples para determinação das porções cristalinas, mas também fornece dados a respeito da estrutura completa do polímero, incluindo a posição de grupos ou átomos pendentos (como por exemplo, átomos de hidrogênio nos cristais de polietileno). Outras informações que podem ainda ser obtidas por esta técnica incluem o tamanho e perfeição dos cristais (CAMPBELL & WHITE, 1989; SILVA, 2013).

Nesta técnica um filamento metálico é aquecido por uma diferença de potencial e emite elétrons para o alvo que absorve a energia desses elétrons e reemite essa energia como radiação X que é então usada para estudos cristalográficos. Quando um cristal é exposto a um feixe monocromático de raios-x, cada cela unitária produz um efeito de difração de raios-x, quando as unidades constituintes da cela unitária estiverem paralelas aos raios incidentes, sendo que o caminho seguido pela radiação X difratada deve ter o mesmo comprimento para todos os átomos de um dado plano (h, k, l) do retículo cristalino (SANTOS, 1989).

Utilizando a Lei de Bragg, e usando raios-x de comprimento de onda  $\lambda$  conhecido, medindo-se o ângulo  $\theta$ , calcula-se d para um dado grupo de planos cristalinos de igual valor de d. A lei de Bragg é expressa pela Equação (1) (SANTOS, 1989; SILVA, 2013).

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (\text{Eq.1})$$

onde,

n = número inteiro positivo;

$\lambda$  = comprimento de onda ( $\text{cm}^{-1}$ );

d = distância entre camadas adjacentes de átomos (mm);

$\theta$  = ângulo entre os raios incidentes e os planos refletidos ( $^{\circ}$ ).

No processo de cristalização, o PHB forma estruturas esferulíticas compostas por uma fase amorfa e outra cristalina. A degradação do polímero ocorre primeiramente na fase amorfa e subsequentemente na fase cristalina. A taxa de degradação é fortemente influenciada pelo grau de cristalinidade do material assim como sua morfologia. O tamanho dos esferulitos

### *Capítulo 3 – Revisão bibliográfica*

influencia diretamente as propriedades mecânicas do polímero, quanto maiores essas estruturas, mais quebradiço o material, assim como influenciam também a taxa de degradação do polímero. O número de esferulitos, tamanho e estrutura fina dependem da temperatura de cristalização, grandes estruturas são formadas em temperaturas próximas de sua temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), enquanto uma grande quantidade de pequenos esferulitos é formada em temperaturas mais baixas (SILVA, 2013).

O PHB e o PHBV são polímeros semicristalinos. O PHB exibe um alto grau de cristalinidade em torno de 60 % a 80 % (Tabela 2), enquanto seu copolímero exibe uma cristalinidade em torno de 30 % a 40 % (Tabela 2) para conteúdos de 3HV superiores a 30 % em mol. O decréscimo nos valores de cristalinidade é decorrente da maior dificuldade que as cadeias poliméricas de PHBV apresentam em se orientar devido à presença do grupo lateral em sua estrutura (SILVA, 2010).

#### **3.4.3 Análises Térmicas**

As análises térmicas envolvem todos os métodos em que as propriedades medidas são obtidas a partir de mudanças na temperatura. Alguns métodos, como a análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) são especificamente designados para medidas das propriedades térmicas do material a ser examinado, como por exemplo, mudanças de entropia ou entalpia (CAMPBELL & WHITE, 1989; GARCIA, 2006).

A utilização de técnicas de análises térmicas, como DSC e análise termogravimétrica (TGA), auxilia na observação das alterações nas propriedades do material antes e depois da degradação. A determinação das propriedades térmicas, tais como, o grau de cristalinidade obtido por meio da entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), a temperatura de fusão ( $T_m$ ) e a  $T_g$  dos polímeros, são obtidas por DSC. O TGA fornece a temperatura inicial de degradação ( $T_{on\ set}$ ) e a temperatura máxima de decomposição ( $T_{decomp}$ ), obtida a partir da primeira derivada, tornando possível avaliar a degradação térmica e a porcentagem de perda de massa dos polímeros (SPIER, 2005).

##### **3.4.3.1 Análise Termogravimétrica (TGA)**

A análise termogravimétrica é definida como o estudo da mudança na massa em



### *Capítulo 3 – Revisão bibliográfica*

função da temperatura, tempo e/ou atmosfera. Para medir a mudança de massa o equipamento dispõe de uma balança sensível (SPIER, 2005). A termogravimetria é uma técnica muito utilizada na caracterização do perfil de degradação de polímeros e outros materiais. A exposição à temperatura elevada pode, algumas vezes, alterar a estrutura química e, por consequência, as propriedades físicas dos materiais. Portanto, a curva de degradação térmica, em condições não isotérmicas, mostra o perfil da resistência ou estabilidade térmica que o material apresenta quando submetido a uma varredura de temperatura (GARCIA, 2006).

A estabilidade térmica é definida como a capacidade da substância em manter suas propriedades o mais próximo possível de suas características iniciais, considerando o ambiente imposto ao material e as funções que ele deve executar (CATONI, 2011). Neste contexto, a baixa estabilidade térmica dos PHAs, em geral, e de PHB em particular, durante o processo de fusão, acarreta uma diminuição substancial na massa molecular, o que leva a uma diminuição da viscosidade de fusão durante a extrusão do PHB (KRUEGER, 2009). Deste modo, como a temperatura de fusão do PHB (180 °C) é próxima da temperatura de degradação térmica (200 °C), o processo de moldagem é prejudicado (FRANCHETTI & MARCONATO, 2006). Neste contexto, Takahashi (2012) relata a importância da busca por copolímeros, os quais apresentam melhores propriedades físicas.

#### **3.4.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica utilizada para determinar as entalpias dos processos de fusão e cristalização (endo e exotérmicos) por comparação com uma referência inerte. O equipamento geralmente varre linearmente uma faixa de temperatura a uma determinada taxa de aquecimento. No DSC do tipo fluxo de calor, a amostra e a referência são aquecidas pela mesma fonte de calor e a diferença de temperatura entre ambas é monitorada em função da temperatura ou do tempo (GARCIA, 2006).

O DSC pode ser empregado na medição de temperaturas de transição vítrea, fusão e cristalização, na determinação da cristalinidade, da presença de moléculas de água ligadas, da influência de aditivos sobre as propriedades dos materiais resultantes (cargas, plastificantes, entre outros), na medição de calor específico, no estudo de reações de polimerização e de cura e, ainda, na avaliação da degradação térmica e oxidativa (CATONI, 2011).

Dentre os polihidroxialcanoatos, o PHB possui uma temperatura de transição vítrea

### Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

entre -5 e 9 °C (Tabela 2) e uma temperatura de fusão cristalina de aproximadamente 180 °C, precisando ser processado acima de 190 °C . Além disso, estes biopolímeros possuem uma densidade na fase cristalina de 1.260 g.cm<sup>-3</sup>, e uma densidade na fase amorfa de 1.177 g.cm<sup>-3</sup> (PACHEKOSKI, 2000).

A temperatura de transição vítrea está associada à região amorfa dos polímeros e representa a temperatura em que a mobilidade das cadeias moleculares se torna restrita pela coesão intermolecular. Em temperaturas acima de  $T_g$ , as cadeias poliméricas podem adquirir suficiente mobilidade para dar início ao processo de cristalização. Abaixo de  $T_g$ , o material não tem energia interna suficiente para permitir o deslocamento de uma cadeia com relação à outra, assim desaparece a mobilidade das cadeias macromoleculares e o material torna-se rígido. Portanto, os polímeros elastoméricos são aqueles com  $T_g$  abaixo da temperatura ambiente (CANEVAROLO, 2002; SOUZA et al., 2004). A incorporação de unidades de valerato ao copolímero diminui a temperatura de transição vítrea, permitindo um maior deslocamento das cadeias a temperaturas mais baixas, tornando o material mais flexível (KRUEGER, 2009).

#### 3.4.4 Determinação de Massa Molecular

Os materiais poliméricos diferenciam-se dos demais por possuir uma cadeia longa, identificada por sua massa molecular. Esta característica exerce grande influência sobre suas propriedades físico-químicas de tal modo que seu conhecimento e controle são de fundamental importância (CANEVAROLO, 2002; GARCIA, 2006).

Na literatura são comumente referenciados três tipos de massa molecular: massa molecular numérica média ( $M_n$ ), massa molecular ponderal média ( $M_w$ ) e massa molecular viscosimétrica média ( $M_v$ ). Em todos os casos, sua determinação exige que o polímero seja solúvel. A  $M_n$  depende do número de moléculas de polímero presentes na solução, a  $M_w$  depende do número e da massa das moléculas em solução e a  $M_v$  depende do número, da massa e também da forma das moléculas presentes na solução. Verifica-se que o valor ponderal médio é mais elevado que o valor numérico médio, e que é mais expressivo no campo dos polímeros, pois valoriza a característica dominante dos polímeros que é o tamanho da molécula. Assim, o quociente,  $M_w/M_n$ , denominado de polidispersão, será tanto maior

### *Capítulo 3 – Revisão bibliográfica*

quanto mais heterogêneas forem as massas molares, ou seja, quanto maior for a distribuição de massa molecular (MANO & MENDES, 1999).

Na determinação da massa molecular numérica média, utilizam-se os processos que medem propriedades coligativas, dentre os quais destacam-se: a crioscopia, ebulioscopia, osmometria e, em casos especiais, a determinação dos grupos funcionais. Pode ainda ser empregado o processo de cromatografia de permeação em gel (GPC). Já no caso da massa molecular ponderal média, são empregados métodos absolutos como espalhamento de luz, a ultracentrifugação e também o GPC. A massa molecular viscosimétrica média é, usualmente, determinada por viscosimetria, que é um método simples e amplamente empregado, porém não é um método absoluto, pois exige o conhecimento de constantes obtidas da literatura ou determinadas empregando polímeros padrão. Cada método permite a determinação de apenas um único e característico tipo de massa molecular à exceção da técnica de GPC (CANEVAROLO, 2002).

#### **3.4.4.1 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)**

A cromatografia de permeação em gel, também conhecida como cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) ou cromatografia por filtração de tamanho, é um dos métodos mais populares de separação e análise de materiais poliméricos. Este método promove uma distribuição seletiva e dinâmica das moléculas do soluto através de uma estrutura estacionária contendo poros de tamanho controlado, e fluxo controlado da fase móvel (SPIER, 2005).

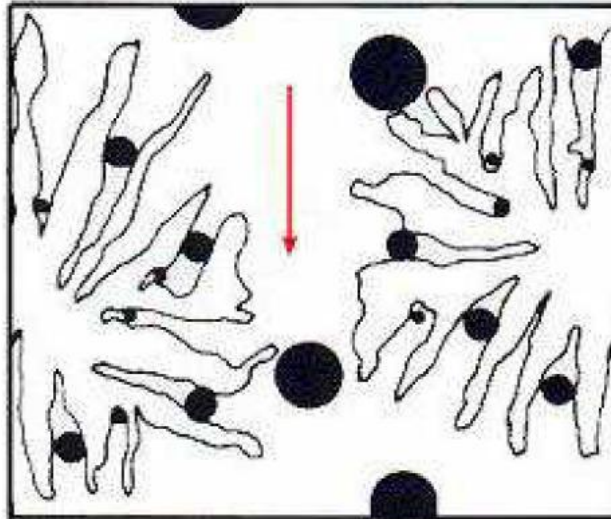
Neste caso, uma solução com o polímero a ser analisado é bombeada através de uma coluna recheada com um gel poroso. Ao penetrarem nos poros, as cadeias menores percorrem um caminho maior que as cadeias maiores, sendo atrasadas em relação a estas (Figura 9). Ao final da coluna de separação, as cadeias de massa molecular maior serão eluídas primeiro, sendo seguidas pelas menores (CANEVAROLO, 2002).

As substâncias presentes nas amostras passam através da coluna, onde são separadas e chegam ao sistema de detecção. Existem vários tipos de detectores, entre eles o de absorção no ultravioleta, visível e infravermelho, fluorescência e índice de refração (SPIER, 2005; CATONI, 2011).

Segundo Nascimento (2001), a massa molecular está diretamente ligada ao processo de extração do polímero do interior dos micro-organismos, considerando que a etapa de

### Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

purificação do mesmo também requer procedimentos operacionais que acarretam uma quebra ou cisão das cadeias poliméricas, isto causa uma queda sensível na massa molecular do polímero virgem.



**Figura 9.** Representação gráfica do princípio de cromatografia por exclusão (SPIER, 2005).

Investigações detalhadas sobre a massa molecular do PHA, acumulado pelas bactérias, são ainda escassas apesar do fato de que esta é uma característica importante, que poderia determinar aplicações a nível industrial. Isto talvez devido ao fato de que grandes quantidades de polímero, geralmente, precisam ser purificadas, a partir de células bacterianas para a análise da massa molecular (SUDESH et al., 2000).

Ainda, segundo Sudesh et al. (2000), para o caso dos [P(3HB)]s, os monômeros (HB) são polimerizados em polímeros com alta massa molecular ponderal média ( $M_w$ ) sendo que a do [P(3HB)] varia entre  $1 \times 10^4$  a  $3 \times 10^6$  Da (Tabela 2), dependendo do micro-organismo e das condições de crescimento, apresentando índice de polidispersividade ( $M_w/M_n$ ) de aproximadamente 2,0.

## *Capítulo 3 – Revisão bibliográfica*

### **3.4.5 Cromatografia à Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-MS)**

Gases ou substâncias volatilizáveis podem ser separados utilizando-se a técnica denominada “cromatografia gasosa” ou “cromatografia à gás”. A separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa) (COLLINS et al., 2006).

No processo de cromatografia gasosa, a amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo de um gás adequado denominado fase móvel ou gás de arraste. Este fluxo de gás, com a amostra vaporizada, passa por um tubo contendo a fase estacionária (coluna cromatográfica), onde ocorre a separação da mistura. A fase estacionária pode ser um sólido adsorvente (Cromatografia Gás-Sólido) ou, mais comumente, um filme de um líquido pouco volátil, suportado sobre um sólido inerte (Cromatografia Gás-Líquido com Coluna Empacotada ou Recheada) ou sobre a própria parede do tubo (Cromatografia Gasosa de Alta Resolução) (RODRIGUES AUGUSTO, 2011).

A cromatografia gasosa é uma técnica com alto poder de resolução, possibilitando a análise de várias substâncias em uma mesma amostra. Dependendo do tipo de substância a ser analisada e do detector empregado, consegue-se detectar cerca de  $10^{-12}$  g do composto por mL de solução. Essa sensibilidade permite que pequenas quantidades de amostra possam ser analisadas. As substâncias separadas saem da coluna dissolvida no gás de arraste e passam por um detector; dispositivo que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de material diluído. O registro deste sinal em função do tempo é o cromatograma, sendo que as substâncias aparecem nele como picos com área proporcional à sua massa, o que possibilita a análise quantitativa (PEREZ, 2002).

O espectrômetro de massas (“Mass Spectrometry”), acoplado ao sistema de cromatografia gasosa, é uma poderosa ferramenta que pode ser utilizada para a determinação de massas atômicas e, vem sendo empregada, na atualidade, na busca de informações sobre a estrutura de compostos orgânicos, como os polihidroxicarboxilatos, na análise de misturas orgânicas complexas, na análise elementar e na determinação da composição isotópica dos elementos (RODRIGUES AUGUSTO, 2011).

### 4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1 Micro-organismos

As estirpes bacterianas *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438 foram fornecidas pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), São Paulo, Brasil.

#### 4.2 Fontes principais de carbono

A glicose monohidratada (Synth) e a glicerina bidestilada P.A. (Synth) foram adotadas como fontes de carbono referência para a produção de polihidroxicanoatos. Além destas, utilizou-se as glicerinas residuais do biodiesel (GRB), as quais foram doadas por três instituições diferentes: COMANCHE Biocombustíveis da Bahia LTDA, Simões Filho, BA, Brasil (GRB I); Planta-piloto de Biodiesel da Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil (GRB II) e PETROBRÁS Biocombustíveis, Candeias, BA, Brasil (GRB III), obtidas pelas respectivas e distintas matérias-primas: soja, óleos e gorduras residuais e mamona.

#### 4.3 Composição das fontes de carbono

##### 4.3.1 Composição centesimal

As fontes de carbono referência (glicose e glicerina P.A.) e as glicerinas residuais do biodiesel GRB I, GRB II e GRB III foram avaliadas, em triplicata, em termos de lipídios totais (BLIGH & DYER, 1957), voláteis a 105 °C (AOAC, 1997), cinzas brutas (AOAC, 1997) e teor residual de proteína bruta (Método de Kjeldahl; AOAC, 1997). O teor de carboidratos foi calculado pela diferença [100 - (cinzas + proteína + voláteis + lipídios) percentagens].

A quantidade de carbono (C) foi calculada a partir dos teores de carboidratos e lipídios totais das fontes principais de carbono. Já a quantidade de nitrogênio (N) foi quantificada a partir do teor de proteína bruta e de sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), adicionado ao meio de cultivo. Posteriormente, fez-se a relação C:N com base na concentração da fonte de carbono.

## Capítulo 4 – Material e métodos

### 4.3.2 Determinação de ácidos graxos das glicerinas residuais do biodiesel

#### 4.3.2.1 Derivação da fração lipídica

Os lipídios totais (BLIGH & DYER, 1957) foram submetidos ao processo de transesterificação para a preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos segundo a metodologia de Joseph e Ackman (1992). Uma alíquota dos lipídios totais (aproximadamente 25 mg) foi submetida à reação de saponificação com NaOH em metanol, seguida de metilação com catalisador BF<sub>3</sub> (12% em metanol), os metil ésteres de ácidos graxos extraídos com iso-octano foram transferidos para frasco âmbar e armazenados em atmosfera inerte (N<sub>2</sub>) em freezer a -18 °C.

#### 4.3.2.2 Composição de ácidos graxos

A separação dos metil ésteres de ácidos graxos foi realizada em cromatógrafo à gás (Varian 3800) equipado com detector de ionização de chama (CG-DIC) e coluna capilar de sílica fundida ELITE-WAX (30 m × 0,32 mm × 0,25 μm). Os parâmetros de análises foram: temperatura do injetor a 250 °C; temperatura do detector a 280 °C; temperatura da coluna programada a 150 °C por 16 minutos e aumentando 2 °C por minuto até 180 °C; permanecendo nessa temperatura por 25 minutos e aumentando 5 °C até 210 °C; e permanecendo nessa temperatura por 25 minutos. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste a 1,3 mL.min<sup>-1</sup>. Foi utilizado nitrogênio como gás make up a 30 mL.min<sup>-1</sup>; fluxo do gás hidrogênio a 30 mL.min<sup>-1</sup>; ar sintético a 300 mL.min<sup>-1</sup>. As injeções foram realizadas em triplicata para cada extração e o volume de injeção foi de 1 μL.

A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos picos das amostras com o tempo de retenção dos ácidos graxos de padrão mix (189-19, Sigma, EUA). A quantificação dos ácidos graxos foi realizada pela adição de padrão interno (C 23:0 Sigma, EUA) aos ésteres metílicos de ácidos graxos extraídos. Os cálculos foram realizados de acordo com a Equação (2) e expressos em mg por 100 g de amostra.

$$\text{Concentração (mg/100g de amostra)} = (A_{AG} \cdot M_{PI} \cdot F \cdot C_{LT} / A_{PI} \cdot M \cdot F_{AG}) \cdot 1000 \quad (\text{Eq.2})$$

## Capítulo 4 – Material e métodos

onde,

$A_{AG}$  = área do pico do éster metílico de ácido graxo no cromatograma da amostra;

$M_{PI}$  = massa do padrão interno adicionada à amostra em mg;

$F$  = fator de correção de resposta de cada éster metílico de ácido graxo no detector de ionização em relação ao C 23:0;

$C_{LT}$  = composição percentual de lipídios totais da amostra;

$A_{PI}$  = área do padrão interno no cromatograma da amostra;

$M$  = massa da amostra em mg;

$F_{AG}$  = fator de conversão de éster metílico de ácidos graxos.

### 4.3.3 Determinação de minerais e metais das fontes principais de carbono e PHAs

A determinação de metais pesados como cádmio (Cd), cromo (Cr) e arsênico (As) em amostras de glicose, glicerinas e PHAs foi realizada por espectroscopia de absorção atômica em forno grafite (Espectrômetro Spectra AA 240Z) e amostrador automático (PSD – 120, Varian, EUA), a fim de verificar a toxicidade dos biopolímeros, o carreamento de minerais e metais das fontes de carbono para os PHAs produzidos e a influência dos minerais no processo de produção de PHA. As determinações de sódio (Na), cobre (Cu) e Zn (zinco) foram realizadas no espectrômetro de absorção atômica no modo chama, e corretor de fundo com lâmpada de arco de deutério (AA-55B, Varian, EUA).

As amostras foram gravimetricamente pesadas, em torno de 50 mg, sendo inseridas e mineralizadas em béqueres de 50 mL com 2 mL de HNO<sub>3</sub> Suprapur (Merck) em chapa de aquecimento a aproximadamente 90 °C, refluxando sob vidro de relógio por duas horas (VIANA et al., 2011). Após resfriar, todo mineralizado foi avolumado para 10 mL em tubos de centrífuga graduado (Corning) com água pura Tipo I (Mili-Q, Milipore).

Branco de reagentes e amostras de referências certificados foram analisados, concomitantemente, em cada corrida para garantia da qualidade analítica. Todas as amostras foram analisadas em triplicata, e sempre injetadas em duplicata no espectrômetro quando era admitida uma variação menor que 10 % entre as repetições (MENEZES-FILHO et al., 2009; VIANA et al., 2011). Os resultados foram expressos pelo espectrômetro em mg.g<sup>-1</sup> ou µg.g<sup>-1</sup> de peso seco.



## Capítulo 4 – Material e métodos

Os seguintes materiais de referência certificados, faixas lineares (FL) e limites de detecção (LoD) foram utilizados para validação dos métodos desenvolvidos, e para avaliar a homogeneidade de pequenas massas de amostras, como mostrado na Tabela 5. Amostras de fígado bovino NIST 1577b (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, EUA) foram utilizados para a detecção de minerais e metais.

**Tabela 5.** Faixas lineares e limites de detecção dos analitos (metais e minerais) investigados.

Analito	Faixa Linear ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )	Limite de Detecção ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ )
Na	2180 a 2660	10
Zn	76 a 88	1,5
Cu	144 a 176	1,50
Cr	0,76 a 1,67	0,20
Cd	0,44 a 0,56	0,25
As	0,90 a 12,10	0,50

### 4.4 Meios de cultura

Os micro-organismos foram conservados a temperatura inferior a 5 °C, em meio ágar nutriente (NA) composto de 5,0 g.L<sup>-1</sup> de peptona de carne, 3,0 g.L<sup>-1</sup> de extrato de carne e 3,75 g.L<sup>-1</sup> de ágar . O repique periódico foi realizado a cada 15 dias, e a inoculação efetuou-se em caldo nutriente (NE), (5,0 g.L<sup>-1</sup> de peptona bacteriológica, 3,0 g.L<sup>-1</sup> de extrato de carne e água destilada), num período de 24 h (CATONI, 2011).

A produção de PHA foi realizada utilizando duas culturas em cada cultivo, de acordo com as metodologias adotadas por Wang et al. (2013) e Catoni (2011). As composições dos meios mineral (MM) e final (MF) e da solução de oligoelementos estão descritas nas Tabelas 6 e 7. O meio mineral (MM) foi utilizado como primeiro meio de cultivo, sem limitação de nitrogênio, e o segundo meio de cultivo, denominado de meio final (MF), foi utilizado na etapa onde se limitou a concentração de nitrogênio. O pH dos meios foi ajustado para 7,0 com NaOH a 10 mol.L<sup>-1</sup> ou 10 mol.L<sup>-1</sup> de HCl.

## Capítulo 4 – Material e métodos

**Tabela 6.** Composição do Meio Mineral (MM).

	I	II	III	
Componente	Concentração da solução estoque (g.L <sup>-1</sup> )	Volume (mL.L <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	Concentração final do meio (g.L <sup>-1</sup> )	
Solução	Ácido nitrilotriacético	19,1	0,19	
	Citrato ferroso de amônia	10	0,06	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	50	0,50	
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	5	0,01	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200	25 <sup>5</sup>	5,00
	Solução de oligoelementos <sup>2</sup>		1	1 mL.L <sup>-1</sup>
	Água destilada <sup>3</sup>			
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	223,8	40	8,95
	Fosfato diácido de potássio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	37,5	40	1,50
	Fonte principal de carbono <sup>4</sup>			15

**Fonte:** CATONI (2011).

<sup>1</sup> Volume retirado da solução estoque para o meio de cultivo.

<sup>2</sup> A composição da solução de oligoelementos é demonstrada na Tabela 7.

<sup>3</sup> O volume de água foi calculado em função das concentrações das soluções da coluna II.

<sup>4</sup> As fontes principais de carbono (glicose e glicerinas) foram adicionadas diretamente ao meio, não havendo armazenamento em solução estoque.

<sup>5</sup> A concentração de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi de 25 g.L<sup>-1</sup> em MM e 19 g.L<sup>-1</sup> em MF, para fins de limitação de nitrogênio, de acordo com as condições otimizadas de Catoni (2011).

**Tabela 7.** Composição da solução de oligoelementos.

Elemento	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )	Elemento	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,3	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,03
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,2	NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,02
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,01
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,03	-	-

**Fonte:** CATONI (2011).

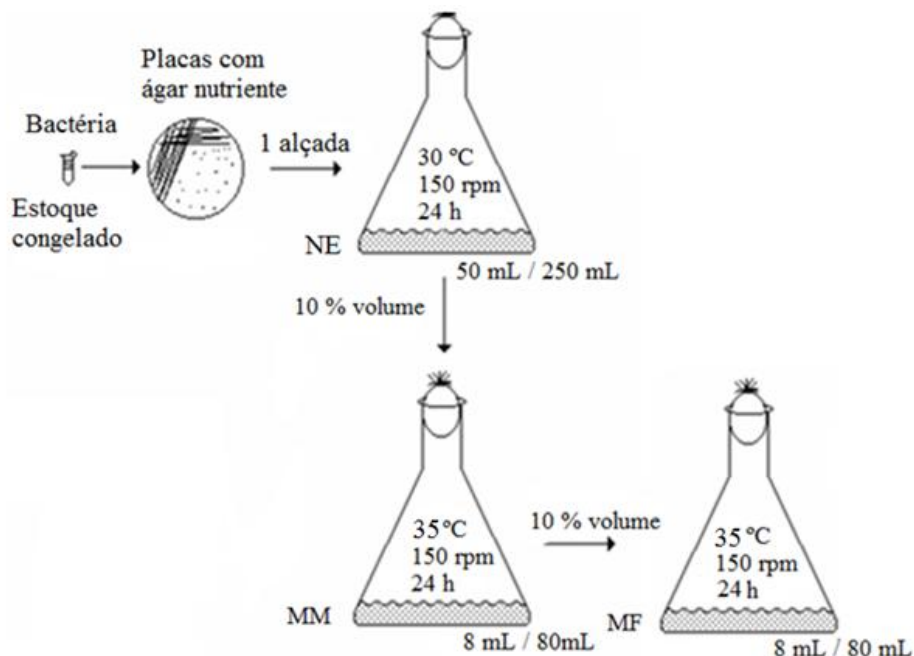
### 4.5 Processo de cultivo para produção de PHA

Para produção de PHAs foram utilizadas duas estirpes bacterianas avaliando cinco fontes principais de carbono, totalizando dez cultivos, processados em triplicata. O esquema do processo fermentativo de produção pode ser visualizado nas Figuras 10 e 11.

Os micro-organismos foram inoculados em 50 mL do meio NE padrão autoclavado (121 °C / 15 min) em frasco erlenmeyer (250 mL), sendo que foram aplicados 10 µL de alçada de micro-organismo em meio de cultura, e incubou-se a 30 °C / 150 rpm / 24 h, em agitador orbital rotativo. Posteriormente, transferiu-se 10 % de inóculo para frascos erlenmeyer (250 mL) contendo 80 mL de MM fermentado a 35 °C, 150 rpm por 24 h. Por

## Capítulo 4 – Material e métodos

fim, adicionou-se 10 % de MM para o MF a 35 °C / 150 rpm / 24 h, em agitador orbital rotativo (Tecnal, mod. TE-424) (CAMPOS et al., 2013, adaptado).



**Figura 10.** Representação esquemática do processo de cultivo por agitador rotativo para produção de PHA.

### 4.6 Separação celular do meio de cultivo

A cultura celular obtida pelo processo fermentativo foi recolhida e centrifugada (HITACHI, modelo CR 22G) utilizando um rotor a 15700  $\times g$  durante 30 min a 4 °C (CAMPOS et al., 2013, adaptado). Os sedimentos foram lavados duas vezes com água destilada e transferidos para frascos de fundo redondo (50 mL) e congelados a -18 °C para subsequente liofilização (LIOBRAS, modelo L101) à -42 °C durante 12 h (CAMPOS et al., 2013, adaptado). A produção de biomassa foi calculada usando o método gravimétrico (AOAC, 1997) e foi expresso em  $\text{g.L}^{-1}$ .

### 4.7 Extração de PHA da célula

Após a liofilização, 0,5 g de células foram re-suspensas em 50 mL de clorofórmio, em frascos de vidro a 85 °C durante 2 h, com agitação vigorosa em agitador magnético com

## Capítulo 4 – Material e métodos

aquecimento, modelo IKA HS 7. Em seguida, a suspensão foi filtrada usando filtros Millipore (0,5 mm de poro, 47 mm de diâmetro), a fim de separar os restos celulares. O clorofórmio contendo o polímero solubilizado foi inserido em placas de petri (previamente pesadas). Estas foram armazenadas em estufa por 24 h, a fim de evaporar o solvente, e obter o biofilme de polihidroxialcanoato. A produção de biomassa e PHA foi determinada pelo método gravimétrico após o processo de extração, e os resultados foram expressos em  $\text{g.L}^{-1}$ . O percentual do processo de extração (% PHA) foi calculado conforme Campos et al. (2013), utilizando-se a Equação (3).

$$\% \text{ PHA} = \text{PHA (g.L}^{-1}) / \text{Biomassa (g.L}^{-1}) \quad (\text{Eq.3})$$

onde,

% PHA = percentual de PHA resultante do processo de extração com solvente;

PHA = concentração de PHA ( $\text{g.L}^{-1}$ );

Biomassa = concentração de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

E a conversão da fonte principal de carbono (GRB) em produto (PHA) foi quantificada, baseando-se em Borzani et al. (2001), através da Equação (4).

$$Y_{P/S} = (P_F - P_o) / (S_o - S_F) \quad (\text{Eq.4})$$

onde,

$Y_{P/S}$  = fator de conversão de fonte de carbono em produto;

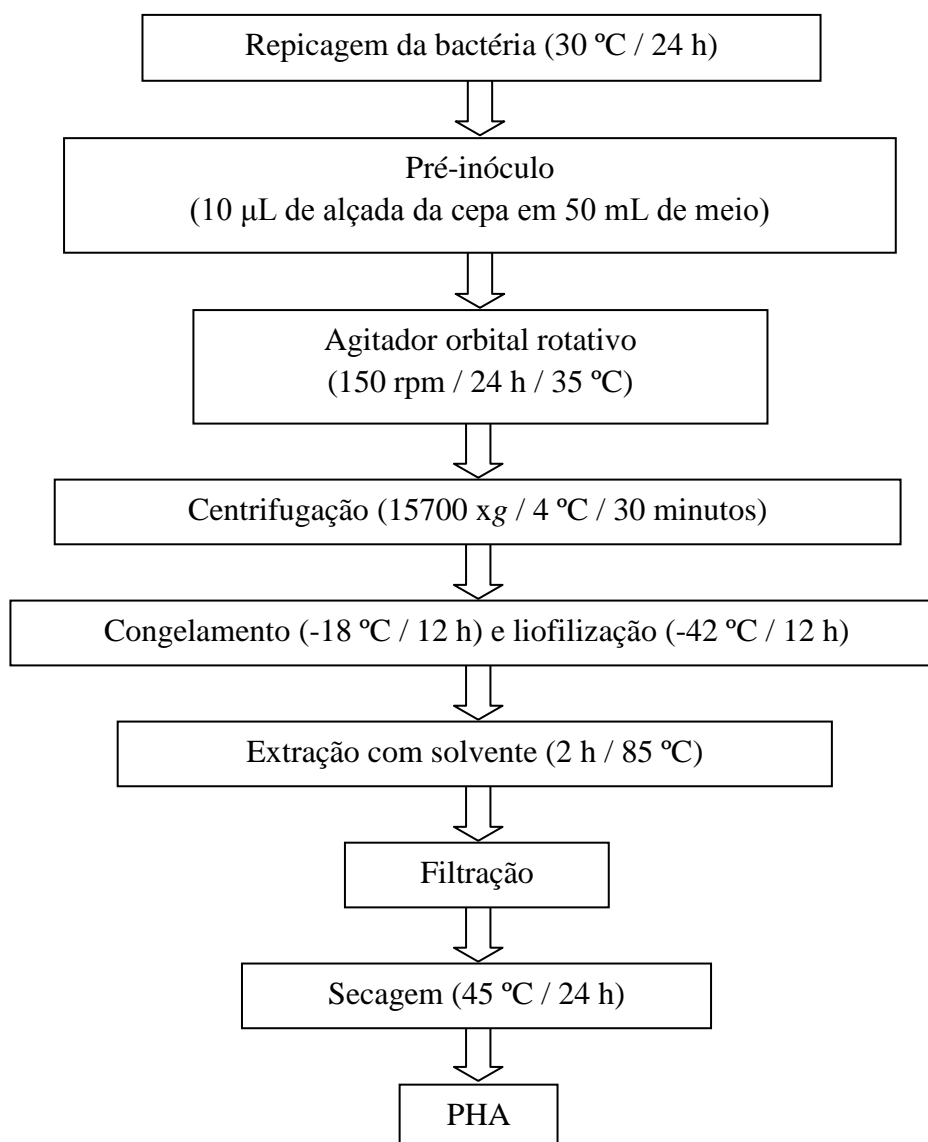
$P_F$  = concentração final de PHA ( $\text{g.L}^{-1}$ );

$P_o$  = concentração inicial de PHA ( $\text{g.L}^{-1}$ ) (convencionou-se produção inicial nula);

$S_F$  = concentração final de fonte de carbono ( $\text{g.L}^{-1}$ ) (convencionou-se consumo completo da fonte de carbono);

$S_o$  = concentração inicial de fonte de carbono ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

## Capítulo 4 – Material e métodos



**Figura 11.** Fluxograma completo de produção de PHA.

### 4.8 Caracterização de PHA

#### 4.8.1 Infra-vermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização dos grupamentos funcionais do PHA foi determinada por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) através do equipamento Perkin Elmer, modelo Spectrum 100 (Waltham, Massachusetts, EUA), no intervalo de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $600\text{ cm}^{-1}$  pela técnica de reflectância total atenuada (ATR) numa frequência de  $600\text{ cm}^{-1}$ .

### 4.8.2 Difractometria de Raios-X (DRX)

O grau de cristalinidade e os picos cristalinos dos PHAs foram quantificados pela técnica de difração ou difratometria de raios-X. Os difratogramas de raios-X das amostras foram obtidos em equipamento SHIMADZU, modelo XRD-6000, com monocromador de grafite, operando com radiação  $\text{CuK}\alpha$  a 40 kV, 30 mA, na região de  $5$  a  $50$   $2\theta$ , em uma velocidade de  $2^\circ.\text{min}^{-1}$ .

O percentual de cristalinidade das amostras foi obtido pelo método de ajuste dos picos dos difratogramas de raios-X, através do software Origin 8.1. O modelo matemático utilizado para o ajuste das gaussianas em cada difratograma foi o de Vonk's (VONK, 1973). Considerou-se para os cálculos a razão do somatório das áreas dos picos cristalinos pela área total de todas as gaussianas de acordo com a Equação (5).

$$\% C = I_c / (I_c + I_a).100 \quad (\text{Eq.5})$$

onde,

% C = grau de cristalinidade;

$I_c$  = somatório das áreas dos picos cristalinos;

$I_a$  = área sob o halo amorfo.

### 4.8.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi utilizada para caracterizar as amostras de PHA em relação à temperatura inicial de degradação ( $T_{\text{on set}}$ ) e a temperatura máxima de decomposição ( $T_{\text{decomp}}$ ). Para isso utilizou-se uma termobalança Perkin Elmer, modelo Pyris 1 TGA (Waltham, Massachusetts, EUA) previamente calibrada com peso padrão de 100 mg. O termopar também foi calibrado, utilizando a temperatura Curie do níquel e do ferro.

Tanto para as amostras, quanto para as análises em branco, utilizou-se cadinho de platina de 45  $\mu\text{L}$ , com área de secção transversal de  $2,47 \times 10^{-5} \text{ m}^2$ , nas seguintes condições: massa da amostra de aproximadamente 5 mg, vazão de  $\text{N}_2$  de 20  $\text{mL}.\text{min}^{-1}$ , razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$  e faixa de temperatura de 25 à 600  $^\circ\text{C}$ .

## Capítulo 4 – Material e métodos

### 4.8.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A temperatura de fusão e o grau de cristalinidade dos PHAs foram determinados pelo método de calorimetria exploratória diferencial. Para esta análise, 2 mg de amostra polimérica de PHA foram encapsulados em uma panela de alumínio e colocada em calorímetro diferencial de varredura, modelo SHIMATZU, série 50. A temperatura variou entre 25 a 200 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup>, utilizando nitrogênio líquido como agente de arrefecimento e hélio como gás de purga.

A temperatura de fusão foi determinada a partir dos picos endotérmicos, e as entalpias de fusão ( $\Delta H_m$ ) foram mensuradas através da área do pico de fusão. O grau de cristalinidade das amostras de PHA ( $\chi_c$ ) foi quantificado por esta técnica, utilizando-se a Equação (6), conforme relatos de Laycock et al. (2013) e Wang et al. (2013).

$$\% \chi_c = \Delta H_m / \Delta H_{m\ 100\%} \quad (\text{Eq.6})$$

onde,

$\% \chi_c$  = grau de cristalinidade;

$\Delta H_m$  = entalpia de fusão;

$\Delta H_{m\ 100\%}$  = entalpia a 100 % de cristalinidade ( $\Delta H_{m\ 100\%}$ ) de PHA, ou seja, 146 J.g<sup>-1</sup>.

### 4.8.5 Massa Molecular (Mw)

A massa molecular dos respectivos PHAs foi estimada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para isso foi utilizado cromatógrafo a líquido Perkin Elmer série 200 configurado com amostrador automático, detector de índice de refração (IR, Perkin Elmer série 200, modelo LC), coluna Shodex 807 KD (30 cm x 78 mm x 5 mm) e forno (Perkin Elmer série 200, modelo OVEN) ajustado à temperatura de 30 °C. Para fase móvel utilizou-se clorofórmio com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup> (CAMPOS et al., 2013). As amostras de biopolímeros foram dissolvidos em clorofórmio a uma concentração final de 0,7 mg.mL<sup>-1</sup>. A solução de polímero resultante foi, então, filtrada em membrana de PTFE de 0,22 µm antes de

## Capítulo 4 – Material e métodos

serem injetadas.

Para determinação da  $M_w$ , uma curva analítica foi construída usando padrões de poliestireno, com um intervalo de 682 a 1.670.000 Da (Poliestireno de Alto  $M_w$  Normas Kit, Polymer Standards Service, EUA).

### 4.8.6 Composição de hidroxiésteres dos copolímeros de PHAs por cromatografia à gás acoplado à espectrometria de massas (CG-MS)

A composição dos copolímeros de PHAs foi determinada utilizando um CG-MS (Perkin Elmer Clarus 500, Software de versão 4.5.0 e *TurboMass*). O cromatógrafo foi ajustado para operação nas seguintes condições: temperatura do injetor: 250 °C; volume de injeção: 1  $\mu$ L; injeção no modo splitless; coluna DB-1 (30 m x 0,25 x 0,25 mm); programação da temperatura na coluna: rampa de 20 °C.min<sup>-1</sup> de 80 °C até 200 °C; e vazão de He 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. Espectrômetro de massas foi ajustado para operar nas seguintes condições: ionização por impacto de elétrons a 70 eV; modo scan na faixa de 50 a 550 m/z. Temperatura de operação do detector: linha de transferência = 180 e fonte iônica = 220.

As amostras foram tratadas da seguinte forma: aproximadamente 0,04 g da amostra seca de PHA foram submetidas à metanólise, conforme método descrito por Braunegg et al. (1978), com as modificações propostas pelo Brandl et al. (1988). Assim, 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 suspensos no vórtex.

Em seguida, os tubos foram levados ao banho termostático, com tampa, a 100 °C, durante 1 h. Decorrido esse tempo, os tubos foram retirados um a um e agitados em vórtex, voltando ao banho por mais 1 h 20 min. Finalmente, os tubos foram retirados do banho quente e levados a um banho de gelo. Após o declínio da temperatura até a temperatura ambiente, acrescentou-se 1 mL de água destilada agitando-se novamente no vórtex por 30 s para a formação de duas fases. Com uma pipeta Pasteur, retirou-se a fase inferior (clorofórmio mais polímero) passando-a aos *vials* para a análise por cromatografia gasosa.

Os hidroxiésteres foram identificados por comparação, através do tempo de retenção, tendo-se como controle o ácido poli[(R)-3-hidroxi-butírico (Sigma-Aldrich). Ainda, comparou-se os espectros de massas com espectros da biblioteca NIST 98 e quantificou-se por normalização de área.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Composição das glicerinas residuais do biodiesel (GRBs) de diferentes fontes

Apesar de a glicerina ser utilizada como fonte de carbono para o crescimento de diversos micro-organismos, poucos trabalhos relatam a sua utilização como substrato para a produção biotecnológica de produtos de valor agregado com potenciais usos industriais (DOBROTH et al., 2011).

Os resultados da composição química das glicerinas residuais do biodiesel (GRBs) utilizadas neste estudo estão expostos na Tabela 8. Os elevados teores de minerais (Na, Zn e Cu), carboidratos (glicerol) e voláteis a 105 °C, principalmente das glicerinas residuais oriundas do processamento do biodiesel de soja (GRB I) e do biodiesel de mamona (GRB III), devem-se provavelmente, aos resíduos das oleaginosas, ácidos graxos livres e triglicerídeos não hidrolisados (GARCÍA I.L. et al., 2013). Além disso, apesar de conter uma quantidade inferior de carboidratos (glicerol) em detrimento das demais, a glicerina residual do processamento de óleos e gorduras residuais (GRB II) apresenta uma quantidade expressiva de lipídios totais e substâncias voláteis.

**Tabela 8.** Composição química das fontes principais de carbono utilizadas na etapa de fermentação em agitador orbital rotativo para obtenção de PHA.

Parâmetros	Fontes principais de carbono				
	Glicose <sup>1</sup>	Glicerina P.A. <sup>1</sup>	GRB I	GRB II	GRB III
Voláteis a 105 °C (%)	0,20 ± 0,01	22,48 ± 0,01	40,91 ± 0,01	61,05 ± 0,01	41,06 ± 0,01
Lipídios totais (%)	0,26 ± 0,02	1,31 ± 0,02	7,41 ± 0,02	12,28 ± 0,03	9,46 ± 0,02
Proteína bruta (%)	ND	ND	2,53 ± 0,03	0,71 ± 0,03	0,54 ± 0,03
Carboidratos (glicerol) (%)	99,54 ± 0,02	76,19 ± 0,02	45,30 ± 0,02	23,01 ± 0,01	43,11 ± 0,02
Cinzas brutas (%)	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	3,85 ± 0,01	2,95 ± 0,01	5,83 ± 0,01
Na (mg.g <sup>-1</sup> )	0,28 ± 0,08	0,19 ± 0,01	1,59 ± 0,19	1,44 ± 0,11	2,11 ± 0,03
Zn (µg.g <sup>-1</sup> )	1,60 ± 0,24	2,01 ± 0,37	3,30 ± 0,70	3,70 ± 0,25	3,50 ± 0,55
Cu (µg.g <sup>-1</sup> )	4,46 ± 0,22	4,17 ± 0,26	1,22 ± 0,29	1,86 ± 0,09	1,29 ± 0,34
Cd (µg.g <sup>-1</sup> )	< LoD	< LoD	< LoD	< LoD	< LoD
Cr (µg.g <sup>-1</sup> )	0,40 ± 0,07	0,30 ± 0,04	0,70 ± 0,17	1,00 ± 0,02	<LoD
As (µg.g <sup>-1</sup> )	< LoD	< LoD	< LoD	< LoD	< LoD
Relação C:N	3,9	3,1	1,9	1,3	1,9

<sup>1</sup> Glicose e Glicerina P.A. foram utilizadas como fontes de carbono referência.

GRB I = oriunda do processamento do biodiesel de soja;

GRB II = oriunda do processamento do biodiesel de óleos e gorduras residuais;

GRB III = oriunda do processamento do biodiesel de mamona;

ND (não detectado); LoD (limite de detecção).

A composição de nutrientes do meio de cultivo, segundo Campos et al. (2013),

## Capítulo 5 – Resultados e discussão

influencia a via de síntese de copolímeros de PHAs. Neste contexto, os teores de voláteis a 105 ° C, lipídios totais, cinzas brutas e de glicerol foram, quantitativamente, majoritários nas GRBs utilizadas no presente estudo (Tabela 8).

A glicerina residual do biodiesel, obtida a partir da soja, também foi estudada por Thompson e He (2006). No que concerne aos teores de lipídios totais, cinzas brutas e Na, os valores encontrados por tais pesquisadores foram 7,98 %, 2,73 % e 1,20 mg.g<sup>-1</sup>, respectivamente, assemelhando-se aos dados quantificados para a GRB I (Tabela 8). Entretanto, os percentuais de carboidratos (45,30 %) e proteína bruta (2,53 %), diferiram dos relatados pelos autores, de 76,2 % e 0,05 %, respectivamente. Esta diferença deve-se, possivelmente, ao processamento do biodiesel.

Além de macro e micro compostos, segundo Thompson e He (2006), as glicerinas derivadas do biodiesel, contém uma variedade de outros elementos, tais como cálcio, magnésio, fósforo e enxofre, independente da fonte de matéria-prima processada.

O perfil de ácidos graxos das GRBs pode ser visualizado através da Tabela 9, havendo o predomínio de ácidos graxos de cadeia média e longa, saturados e insaturados, sendo estes, principalmente, palmítico (C 16:0), oléico (C 18:1 $\omega$ 9c) e linoléico (C 18:2 $\omega$ 6c). A quantidade expressiva de ácidos graxos presentes na glicerina residual justifica-se pela transesterificação química incompleta durante o processamento dos óleos vegetais (soja e mamona) e/ou gorduras animais para a obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos (MIESIAC et al., 2013).

Segundo Rodrigues (2005), *Cupriavidus necator* e *Burkholderia cepacia* utilizam os ácidos graxos livres como fontes de carbono, e são por sua vez convertidos em compostos, como alcanos, alcanóis ou ácidos alcanóicos. Deste modo, durante o processo de biossíntese de PHAs, esses ácidos são ativados por enzimas como a tioquinase e são normalmente degradados via  $\beta$ -oxidação, resultando na formação de acetil-CoA. Assim, o [P(3HB)] e copolímeros de PHAs podem ser formados, a partir de acetil-CoA (Figura 7) e os intermediários da rota de  $\beta$ -oxidação podem ser direcionados para a síntese de [P(3HB)] e outros PHAs de cadeia média (RODRIGUES, 2005).

A utilização das GRBs para a produção microbiana de PHA pode, em médio prazo levar à substituição de fontes de carbono e de suplementos de nutrientes dispendiosos, diminuindo os custos de produção deste biopolímero, tornando sua utilização mais competitiva com os polímeros comerciais não biodegradáveis (VAN-THUOC et al., 2008).

## Capítulo 5 – Resultados e discussão

**Tabela 9.** Concentração de ácidos graxos das glicerinas residuais do biodiesel (GRBs) I, II e III em mg por 100g de amostra e em percentagem (%).

Ácido graxo	GRB I	GRB II	GRB III
<b>Saturados</b>			
C 4:0	21,46 ± 0,12 (0,86 ± 0,03)	ND	7,69 ± 0,02 (0,79 ± 0,01)
C 6:0	21,26 ± 0,03 (0,85 ± 0,02)	ND	45,35 ± 0,04 (4,65 ± 0,58)
C 8:0	ND	ND	11,09 ± 0,02 (1,14 ± 0,04)
C 10:0	ND	ND	7,41 ± 0,06 (0,76 ± 0,02)
C 14:0	50,97 ± 0,18 (2,04 ± 0,14)	ND	34,65 ± 0,24 (3,55 ± 0,02)
C 16:0	751,17 ± 0,34 (30,06 ± 0,52)	1277,45 ± 0,36 (17,88 ± 0,20)	397,92 ± 0,84 (40,79 ± 0,89)
C 17:0	12,92 ± 0,05 (0,52 ± 0,03)	ND	24,42 ± 0,16 (2,50 ± 0,45)
C 18:0	238,96 ± 0,20 (9,56 ± 0,28)	261,87 ± 0,16 (3,67 ± 0,01)	134,84 ± 0,74 (13,82 ± 0,50)
<b>Monoinsaturados</b>			
C 16:1 $\omega$ 7	26,29 ± 0,14 (1,05 ± 0,04)	38,77 ± 0,02 (0,54 ± 0,02)	ND
C 18:1 $\omega$ 9c	730,00 ± 0,52 (29,21 ± 0,72)	2072,65 ± 0,41 (29,01 ± 0,04)	239,87 ± 0,23 (24,59 ± 0,96)
C 20:1 $\omega$ 9	ND	ND	20,21 ± 0,03 (2,07 ± 0,15)
<b>Poliinsaturados</b>			
C 18:3 $\omega$ 3	ND	169,95 ± 0,25 (2,38 ± 0,01)	ND
C 18:2 $\omega$ 6c	617,94 ± 0,42 (24,73 ± 0,03)	3250,49 ± 0,31 (45,49 ± 0,13)	23,07 ± 0,05 (2,37 ± 0,06)
$\Sigma$ AGS	1105,54 (44,24)	1598,34 (22,37)	687,61 (70,49)
$\Sigma$ AGMI	763,71 (30,56)	2126,14 (29,76)	264,76 (27,14)
$\Sigma$ AGPI	629,79 (25,20)	3420,44 (47,87)	23,07 (2,37)

Médias com respectivos desvios padrão. Ácidos graxos com valores de área percentual menor que 0,5 % não foram tabelados, mas aparecem nos somatórios.

GRB I = oriunda do processamento do biodiesel de soja;

GRB II = oriunda do processamento do biodiesel de óleos e gorduras residuais;

GRB III = oriunda do processamento do biodiesel de mamona;

$\Sigma$ AGS = somatório ácidos graxos saturados;

$\Sigma$ AGMI = somatório ácidos graxos monoinsaturados;

$\Sigma$ AGPI = somatório ácidos graxos poliinsaturados;

ND (não detectado); NI (não identificado).

### 5.2 Efeito das diferentes fontes de glicerinas residuais do biodiesel (GRBs) na produção de biomassa e de copolímeros de PHAs

A influência das diferentes fontes de glicerinas residuais do biodiesel (GRBs) na produção de biomassa e de copolímeros de PHAs por *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438 são mostradas nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

A conversão da fonte de carbono em PHA, utilizando-se GRBs, por *Cupriavidus necator* IPT 027 foi, em média, 0,09 g PHA / g GRB (Eq.4), enquanto que em *Burkholderia cepacia* IPT 438, obteve-se, em média, 0,10 g PHA / g GRB (Eq.4). Estes resultados assemelham-se aos dados publicados por Ibrahim e Steinbüchel (2010), de 0,09 g PHA / g de glicerina bruta em agitador orbital rotativo a 41 °C / 96 h / 200 rpm pela cepa *Zobellella*

## Capítulo 5 – Resultados e discussão

*denitrificans*, e Kawata e Aiba (2010), de 0,13 g PHA / g de glicerina bruta em agitador orbital rotativo a 30 °C / 60 h / 150 rpm pela cepa *Halomonas* sp.

**Tabela 10.** Produção quantitativa de biomassa (g.L<sup>-1</sup>) a partir de diferentes linhagens bacterianas e distintas fontes de carbono em agitador orbital rotativo (35 °C, 24 h, pH 7, 150 rpm).

Estirpes bacterianas	Principais fontes de carbono				
	Referência		Alternativos		
	Glicose	Glicerina P.A.	GRB I	GRB II	GRB III
<i>Cupriavidus necator</i> IPT 027	4,26 ± 0,13 <sup>Aa</sup>	3,04 ± 0,15 <sup>Ba</sup>	1,99 ± 0,14 <sup>Ca</sup>	1,97 ± 0,18 <sup>Ca</sup>	2,31 ± 0,16 <sup>Ca</sup>
<i>Burkholderia cepacia</i> IPT 438	3,02 ± 0,11 <sup>Ab</sup>	2,91 ± 0,13 <sup>Aa</sup>	2,34 ± 0,17 <sup>Ba</sup>	2,28 ± 0,19 <sup>Ba</sup>	2,41 ± 0,17 <sup>Ba</sup>

Médias, seguidas por distintas letras maiúsculas, na horizontal mostram diferenças entre as fontes de carbono, e letras minúsculas, na vertical mostram diferenças entre as cepas (P < 0,05) pelo teste de Tukey.

GRB I = oriunda do processamento do biodiesel de soja;

GRB II = oriunda do processamento do biodiesel de óleos e gorduras residuais;

GRB III = oriunda do processamento do biodiesel de mamona.

**Tabela 11.** Produção quantitativa de PHA (g.L<sup>-1</sup>) a partir de diferentes linhagens bacterianas e distintas fontes de carbono em agitador orbital rotativo (35 °C, 24 h, pH 7, 150 rpm).

Estirpes bacterianas	Principais fontes de carbono				
	Referência		Alternativos		
	Glicose	Glicerina P.A.	GRB I	GRB II	GRB III
<i>Cupriavidus necator</i> IPT 027	2,41 ± 0,10 <sup>Aa</sup>	1,95 ± 0,14 <sup>Bb</sup>	1,34 ± 0,19 <sup>Ca</sup>	1,40 ± 0,12 <sup>Ca</sup>	1,52 ± 0,15 <sup>Ca</sup>
<i>Burkholderia cepacia</i> IPT 438	2,58 ± 0,10 <sup>Aa</sup>	2,45 ± 0,15 <sup>Aa</sup>	1,49 ± 0,18 <sup>Ba</sup>	1,45 ± 0,14 <sup>Ba</sup>	1,60 ± 0,16 <sup>Ba</sup>

Médias, seguidas por distintas letras maiúsculas, na horizontal mostram diferenças entre as fontes de carbono, e letras minúsculas, na vertical mostram diferenças entre as cepas (P < 0,05) pelo teste de Tukey.

GRB I = oriunda do processamento do biodiesel de soja;

GRB II = oriunda do processamento do biodiesel de óleos e gorduras residuais;

GRB III = oriunda do processamento do biodiesel de mamona.

A produção tanto de biomassa quanto de PHA foi estatisticamente semelhante, quando se admitiu como fontes principais de carbono as GRBs I, II e III, numa concentração de 15 g.L<sup>-1</sup> de meio, comparando-se com as produções microbianas derivadas das fontes de referência. Além disso, para ambas as cepas, a produção quantitativa de biomassa e PHA foram superiores quando glicose e glicerina P.A., nas mesmas concentrações, foram utilizadas (Tabelas 10 e 11). Este fato deve-se, possivelmente, à complexidade macromolecular e micromolecular (Tabelas 8 e 9) das GRBs em detrimento das estruturas orgânicas da glicose e da glicerina P.A.

A maior produção de PHA obtida por glicose e glicerina P.A. deve-se ao fato de que diferentes fontes de carbono são transportadas, intracelularmente, por diferentes sistemas, e metabolizadas por distintas vias na produção destes copolímeros (SPOLJARIC et al., 2013). Deste modo, quando a glicose ou a glicerina P.A. atuam como fontes de carbono, estas são

## Capítulo 5 – Resultados e discussão

ativamente canalizadas para as células, nas quais são, rapidamente, fosforiladas e catabolizadas através da via Entner-Doudoroff (RABERG et al., 2011). Os ácidos graxos da glicerina são transportados por difusão facilitada através da membrana citoplasmática (SPOLJARIC et al., 2013). Além disso, estes ácidos graxos devem ser ativados por coenzima A (CoA) antes de serem metabolizados pela via de  $\beta$ -oxidação (BRIGHAM et al., 2010).

Portanto, a quantidade de polihidroxicanoato produzida, microbiologicamente, depende de vários fatores (SHAHID et al., 2013). O tipo da estirpe bacteriana e a fonte de carbono assimilada são os fatores primários (SEVIOUR et al., 2003; SHAHID et al., 2013). Estes fatores estão, por sua vez, ligados às condições de cultivo empregadas (CHEE et al., 2010; GARCÍA Y.G. et al., 2013).

As cepas de *Cupriavidus necator* IPT 027 e de *Burkholderia cepacia* IPT 438 produziram quantidades similares de biomassa e de PHAs, independente da fonte de GRB utilizada no meio de cultivo, considerando os desvios padrões (Tabelas 10 e 11). Estes microorganismos são classificados, como os maiores produtores e influenciadores das propriedades dos polihidroxicanoatos (SPOLJARIC et al., 2013). Entretanto, apesar do *Cupriavidus necator* ser também considerado o que mais produz PHA a partir de diferentes fontes de carbono, *Burkholderia cepacia* produziu quantidades comparáveis do biopolímero, principalmente, a partir de glicerina residual do biodiesel e da glicerina P.A. (SPOLJARIC et al., 2013).

Juntamente com a fonte de carbono do meio de cultivo, que é decisiva tanto para o crescimento microbiano quanto para a biossíntese de PHA, é importante garantir também o abastecimento suficiente de nitrogênio. Um fornecimento limitado deste nutriente pode ser considerado um dos principais fatores de regulação para a produção de PHA (ZINN et al., 2004). Por isso, é vital a avaliação da relação C:N (Tabela 8) (ZINN et al., 2004). Desta forma, um dos fatores que também pode estar relacionado às menores produções de biomassa e de PHA a partir das GRBs (Tabelas 10 e 11), é a baixa relação C:N destas fontes de carbono (Tabela 8). Contudo, esta razão pode ser retificada, a partir da otimização das concentrações de reagentes e fontes de carbono durante o processo de cultivo.

Segundo Campos et al. (2013), altas concentrações de GRB, e conseqüentemente de impurezas, como íons sódio ( $\text{Na}^+$ ), podem interferir na produção de PHA. A concentração de íons sódio foi de 0,19  $\text{mg.g}^{-1}$  ou 0,02 % (w/w) na glicerina P.A., enquanto nas GRBs oriundas do biodiesel foi, aproximadamente, 10 vezes maior, atingindo 2,11  $\text{mg.g}^{-1}$  ou 0,21 % (w/w)

## *Capítulo 5 – Resultados e discussão*

na GRB III oriunda de mamona (Tabela 8). Contudo, notou-se uma redução expressiva da concentração de íons Na<sup>+</sup> das fontes de carbono para os biopolímeros resultantes (Tabelas 8 e 13). Deste modo, possivelmente, o sódio em meio de cultivo, não foi um fator inibitório para a produção de PHAs pelos micro-organismos utilizados no presente estudo, ao contrário do que supõe Campos et al. (2013).

Apesar das impurezas inerentes da glicerina residual do biodiesel, Silva et al. (2009) já apontavam o coproduto como sendo uma fonte de carbono abundante para a microbiologia industrial. Além da produção de polihidroxialcanoatos, os autores destacam, ainda, a bioconversão do glicerol em outros produtos de alto valor agregado através de fermentação microbiana, como 1,3-propanodiol, ácido succínico, ácido propiônico, etanol, ácido cítrico, pigmentos e biosurfactantes.

O percentual de extração do PHA das células de *Cupriavidus necator* IPT 027 com GRB II foi estatisticamente superior, a 95 % de confiança, quando comparado aos percentuais de PHAs obtidos a partir das demais fontes principais de carbono (Tabela 12). O percentual acumulado de PHA por *Burkholderia cepacia* IPT 438 manteve-se, estatisticamente superior e constante quando glicose e glicerina P.A. foram utilizadas, comparando-se com os percentuais verificados quando as GRBs I, II e III foram adotadas como fontes principais de carbono. Entretanto, os valores correspondentes aos percentuais de extração de PHAs obtidos através do cultivo com GRBs, em agitador orbital rotativo, são superiores aos relatados por Campos et al. (2013), os quais descrevem 65 %, em biorreator fermentativo, com glicerina bruta e cepa *Cupriavidus necator* IPT 026.

**Tabela 12.** Percentual de extração de PHA (%), por diferentes micro-organismos e distintas fontes de carbono em agitador orbital rotativo (35 °C, 24 h, pH 7, 150 rpm).

Estirpes bacterianas	Principais fontes de carbono				
	Referência		Alternativos		
	Glicose	Glicerina P.A.	GRB I	GRB II	GRB III
<i>Cupriavidus necator</i> IPT 027	56,5 ± 0,62 <sup>Db</sup>	64,14 ± 0,81 <sup>Cb</sup>	67,34 ± 0,56 <sup>Ba</sup>	71,07 ± 0,41 <sup>Aa</sup>	65,80 ± 0,82 <sup>BCa</sup>
<i>Burkholderia cepacia</i> IPT 438	85,43 ± 0,46 <sup>Aa</sup>	84,19 ± 0,65 <sup>Aa</sup>	63,68 ± 0,74 <sup>Cb</sup>	63,60 ± 0,85 <sup>Cb</sup>	67,39 ± 0,76 <sup>Ba</sup>

Médias com respectivos desvios padrão, seguidas por diferentes letras maiúsculas, na horizontal mostram diferença entre as fontes de carbono, e letras minúsculas, na vertical mostram diferenças entre as cepas (P < 0,05) pelo teste de Tukey.

GRB I = oriunda do processamento do biodiesel de soja;

GRB II = oriunda do processamento do biodiesel de óleos e gorduras residuais;

GRB III = oriunda do processamento do biodiesel de mamona.

As gliceras residuais são potenciais produtoras de polihidroxialcanoatos, já que são importantes fontes de carbono e apresentam, segundo Thompson e He (2006), uma baixa

## Capítulo 5 – Resultados e discussão

concentração de proteínas brutas, como também verificado em estudo (Tabela 8). Deste modo, a síntese de PHA foi, provavelmente, impulsionada pela limitação de macronutrientes, principalmente no que concerne ao nitrogênio orgânico (POSADA et al., 2011; CAMPOS et al., 2013). Logo, o desempenho do processo de extração (Tabela 12) confirma o potencial destas glicerinas na produção de biomassa e de PHA.

### 5.3 Caracterização dos PHAs

#### 5.3.1 Composição de minerais e metais

A composição dos minerais dos copolímeros de PHAs está relacionada na Tabela 13. A princípio, os minerais Na, Zn e Cu apresentaram valores dentro do limite de detecção do espectrômetro de absorção atômica, permitindo a quantificação. No que concerne aos metais pesados, estes não foram quantificados, uma vez que apresentaram valores inferiores aos limites de detecção do equipamento, descritos em metodologia.

**Tabela 13.** Composição de minerais em PHAs produzidos pelas cepas *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438 a partir de glicose, glicerina P.A. e GRBs I, II e III.

Fonte principal de carbono	<i>Cupriavidus necator</i> IPT 027			<i>Burkholderia cepacia</i> IPT 438		
	Na (mg.g <sup>-1</sup> )	Zn (µg.g <sup>-1</sup> )	Cu (µg.g <sup>-1</sup> )	Na (mg.g <sup>-1</sup> )	Zn (µg.g <sup>-1</sup> )	Cu (µg.g <sup>-1</sup> )
Glicose	0,14 ± 0,05 <sup>Cb</sup>	1,14 ± 0,02 <sup>Bd</sup>	2,66 ± 0,08 <sup>Aa</sup>	0,16 ± 0,04 <sup>Cb</sup>	1,21 ± 0,05 <sup>Bb</sup>	2,41 ± 0,05 <sup>Aa</sup>
Glicerina P.A.	0,12 ± 0,02 <sup>Db</sup>	2,31 ± 0,06 <sup>Ab</sup>	2,11 ± 0,04 <sup>Cb</sup>	0,11 ± 0,05 <sup>Db</sup>	1,69 ± 0,02 <sup>Bb</sup>	1,96 ± 0,08 <sup>Cb</sup>
GRB I	0,13 ± 0,04 <sup>Eb</sup>	1,84 ± 0,02 <sup>Ac</sup>	0,65 ± 0,01 <sup>De</sup>	0,12 ± 0,07 <sup>Eb</sup>	1,70 ± 0,03 <sup>Bb</sup>	0,85 ± 0,02 <sup>Cd</sup>
GRB II	0,31 ± 0,02 <sup>Ea</sup>	2,70 ± 0,05 <sup>Aa</sup>	1,78 ± 0,06 <sup>Cc</sup>	0,11 ± 0,07 <sup>Fb</sup>	2,50 ± 0,07 <sup>Ba</sup>	1,12 ± 0,08 <sup>Dc</sup>
GRB III	0,24 ± 0,04 <sup>Da</sup>	1,01 ± 0,03 <sup>Be</sup>	0,95 ± 0,01 <sup>Cd</sup>	0,35 ± 0,05 <sup>Da</sup>	1,21 ± 0,01 <sup>Ab</sup>	0,87 ± 0,02 <sup>Cd</sup>

Médias com respectivos desvios padrão, seguidas por diferentes letras maiúsculas, na horizontal mostram diferenças entre as cepas, e letras minúsculas, na vertical mostram diferença entre as fontes de carbono (P < 0,05) pelo teste de Tukey.

GRB I = oriunda do processamento do biodiesel de soja;

GRB II = oriunda do processamento do biodiesel de óleos e gorduras residuais;

GRB III = oriunda do processamento do biodiesel de mamona;

Os metais pesados Cr, Cd e As não foram quantificados, já que os resultados foram inferiores ao limite de detecção do espectrômetro de absorção atômica.

Os PHAs produzidos por *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438, utilizando-se GRB II como fonte principal de carbono apresentaram concentrações superiores de Zn. Já os PHAs com maiores concentrações de cobre foram os produzidos a partir de glicose por ambas as estirpes bacterianas. Os minerais, apesar de estarem em

## Capítulo 5 – Resultados e discussão

pequenas concentrações, foram, notoriamente, carregados das respectivas fontes de carbono aos biopolímeros produzidos, o quê justifica o conjunto de resultados inseridos na Tabela 13.

Os teores de cobre presentes nas GRBs (Tabela 8) e nos correspondentes PHAs produzidos por *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438 (Tabela 13) apresentam correlações diretamente proporcionais ( $R^2 = 0,8348$  e  $R^2 = 0,9736$ , respectivamente) indicando que os micro-organismos utilizaram, além do Na e o Zn, o mineral Cu em quantidades expressivas para a reprodução celular. Além disso, como as GRBs apresentam um elevado teor nutricional (Tabela 8), reagentes inseridos no processo de cultivo com o propósito de aumentar a carga mineral do meio, podem ser naturalmente insetos do processo, reduzindo os custos de produção.

Várias organizações mundiais estabelecem padrões de resíduos de plásticos biodegradáveis como os PHAs, incluindo a American Society for Testing and Materials (ASTM), o European Committee for Standardization (CEN), a International Standards Organization (ISO), o German Institute for Standardization (DIN), o Japanese Institute for Standardization (JIS), e a British Plastics Federation. Os padrões estabelecidos por essas organizações auxiliam o setor industrial a criar produtos biodegradáveis que estarão em conformidade com a crescente demanda mundial, garantindo segurança aos consumidores e ao meio ambiente (NARAYAN & MOJO, 1999). Os limites de metais em embalagens plásticas, segundo os padrões europeus e dos Estados Unidos são de  $100 \mu\text{g.g}^{-1}$  (EUA) e  $1400 \mu\text{g.g}^{-1}$  (Europa) para o Zn, e de  $22500 \mu\text{g.g}^{-1}$  (EUA) e  $750 \mu\text{g.g}^{-1}$  (Europa) para o Cu (CITY OF ORILLA BIODEGRADABLE BAG STUDY, 2003). Desta forma, os PHAs produzidos no presente estudo, a partir de glicerinas residuais do biodiesel de diferentes fontes vegetais e animais (Tabela 13) apresentam concentrações destes minerais muito inferiores aos limites estabelecidos, sendo de uso potencial para diversos fins aplicativos, sem oferecer risco ao consumidor e ao meio ambiente.

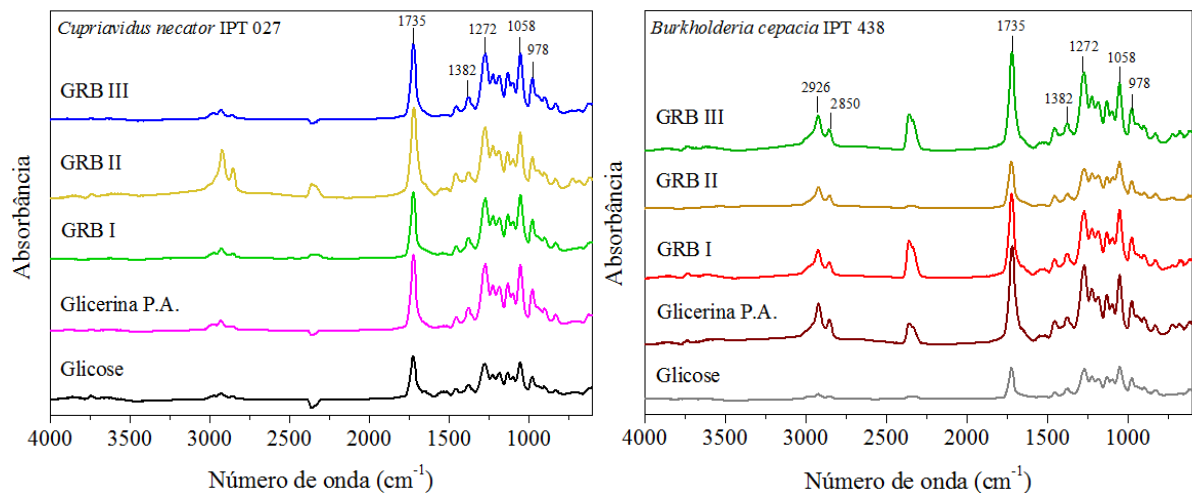
### 5.3.2 Infra-vermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros FTIR dos PHAs produzidos pelas cepas bacterianas e respectivas fontes de carbono são mostrados na Figura 12, onde várias bandas características de PHAs são observadas na região de  $4000 \text{ cm}^{-1}$  a  $450 \text{ cm}^{-1}$ , independente da cepa ou fonte principal de carbono utilizada em cultivo. Em todos os biopolímeros produzidos, três bandas principais



## Capítulo 5 – Resultados e discussão

são visualizadas nos espectros: uma de  $1735\text{ cm}^{-1}$  (fase semi-cristalina), correspondente a deformação axial da carbonila (C=O) (YANG et al., 2009), e outras duas em  $1272\text{ cm}^{-1}$  (fase cristalina) e  $1058\text{ cm}^{-1}$ , as quais correspondem ao estiramento assimétrico e simétrico do grupo (C–O–C) (YANG et al., 2009; XU et al., 2002; KHAN et al., 2012).



**Figura 12.** Espectros de FTIR dos PHAs produzidos por *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438 a partir de glicose, glicerina P.A., GRB I (oriunda do processamento do biodiesel de soja), GRB II (oriunda do processamento do biodiesel de óleos e gorduras residuais) e GRB III (oriunda do processamento do biodiesel de mamona).

As bandas relacionadas com a deformação angular simétrica no plano dos grupos metila ( $\text{CH}_3$ ) e da vibração da carbonila do grupo éster (C–C) estão representadas em  $1382\text{ cm}^{-1}$  (YANG et al., 2009) e  $978\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Para os PHAs produzidos por *Cupriavidus necator* IPT 027 a partir da GRB II, e por *Burkholderia cepacia* IPT 438 (exceto quando a fonte de carbono é glicose) observa-se as bandas  $2926\text{ cm}^{-1}$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$ , as quais correspondem à vibração de estiramento da ligação carbono-hidrogênio (C–H) (BARUD et al., 2011; SILVA et al., 2012).

### 5.3.3 Difratometria de Raios-X (DRX)

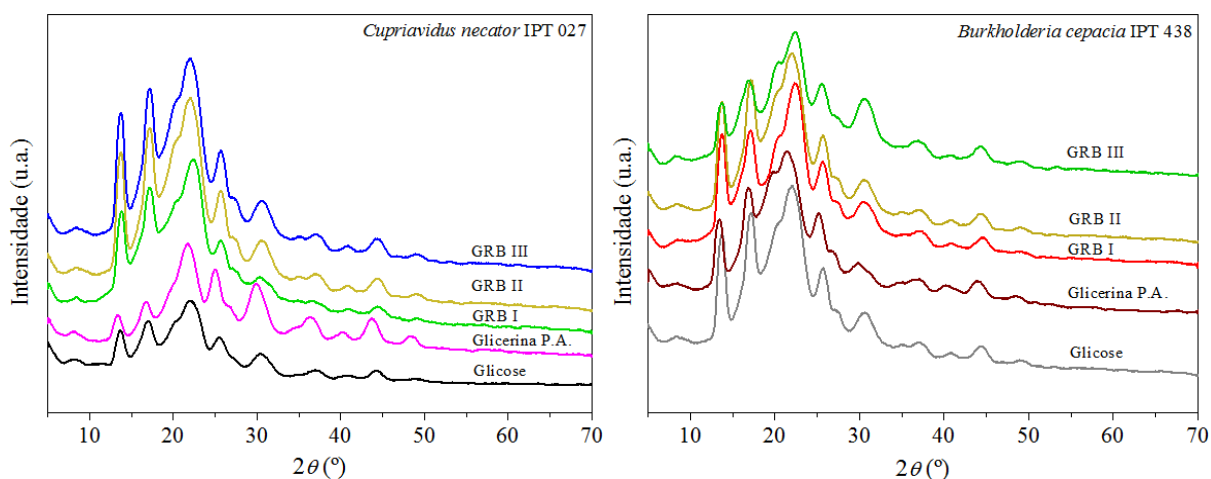
Os perfis de difração de raios-X dos PHAs são mostrados na Figura 13 e Tabela 14. Os difratogramas apresentaram picos de difração em  $2\theta$ , típicos de poliésteres semi-cristalinos, em torno de  $13,5^\circ$ ;  $17^\circ$ ;  $21^\circ$  e  $25^\circ$  para todos os PHAs (CATONI et al., 2013), indicando uma fase cristalina nas composições. Este conjunto de valores assemelha-se aos

## Capítulo 5 – Resultados e discussão

trabalhos publicados por Barud et al. (2011) e Silva et al. (2013).

O grau de cristalinidade, determinado pelo método de Ruland's (LI et al., 2008), variou de 35,92 % a 66,07 % (Tabela 14) para os PHAs acumulados por *Cupriavidus necator* IPT 027. Observou-se nestes biopolímeros, um decréscimo, acentuado, da cristalinidade de acordo com a fonte principal de carbono adotada, ou seja, houve expressiva influência destas fontes (glicose, glicerina P.A. e as GRBs) na cristalinidade das amostras.

No entanto, para os PHAs produzidos por *Burkholderia cepacia* IPT 438, visualizou-se valores de cristalinidade (48,10 % a 49,70 %, Tabela 14) bastante semelhantes, para todas as fontes de carbono em estudo, apesar de serem, estatisticamente, diferentes a 95 % de confiança. Portanto, o grau de cristalinidade dos PHAs produzidos pela cepa *Cupriavidus necator* IPT 027 é dependente da composição do meio de cultivo, enquanto os PHAs produzidos por *Burkholderia cepacia* IPT 438 não dependem desta variável.



**Figura 13.** Difratoformas de raios-X dos PHAs produzidos pelas cepas *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438 a partir de glicose, glicerina P.A., GRB I (oriunda do processamento do biodiesel de soja), GRB II (oriunda do processamento do biodiesel de óleos e gorduras residuais) e GRB III (oriunda do processamento do biodiesel de mamona).

O grau de cristalinidade está diretamente relacionado à processabilidade e as aplicações industriais dos polihidroxialcanoatos (GALEGO et al., 2000). Desta forma, a cepa *Burkholderia cepacia* IPT 438 apresenta a vantagem competitiva de biossintetizar PHAs com o mesmo grau de cristalinidade, independente da composição do meio de cultivo.

Segundo Laycock et al. (2013), a cristalinidade igual ou superior a 50 % é elevada e prejudicial para fins comerciais e industriais. Neste contexto, a maioria dos PHAs obtidos

## Capítulo 5 – Resultados e discussão

apresentaram cristalinidade, consideravelmente, baixa e comparáveis aos valores relatados por Bengtsson et al. (2010) (58 %) e Campos et al. (2013) (52,23 %).

**Tabela 14.** Grau de cristalinidade de PHAs produzidos pelas cepas *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438 a partir de glicose, glicerina P.A. e GRBs I, II e III, por método de difratometria.

Fonte principal de carbono	% C	
	<i>Cupriavidus necator</i> IPT 027	<i>Burkholderia cepacia</i> IPT 438
Glicose	66,07 ± 0,16 <sup>Aa</sup>	48,60 ± 0,01 <sup>Bb</sup>
Glicerina P.A.	57,09 ± 0,03 <sup>Ba</sup>	49,70 ± 0,01 <sup>Ab</sup>
GRB I	42,89 ± 0,04 <sup>Cb</sup>	48,30 ± 0,01 <sup>Da</sup>
GRB II	39,88 ± 0,02 <sup>Db</sup>	48,10 ± 0,01 <sup>Ea</sup>
GRB III	35,92 ± 0,15 <sup>Eb</sup>	48,40 ± 0,01 <sup>Ca</sup>

Médias com respectivos desvios padrão, seguidas por diferentes letras maiúsculas, na vertical mostram diferença entre as fontes de carbono, e letras minúsculas, na horizontal mostram diferença entre as cepas ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

GRB I = oriunda do processamento do biodiesel de soja;

GRB II = oriunda do processamento do biodiesel de óleos e gorduras residuais;

GRB III = oriunda do processamento do biodiesel de mamona.

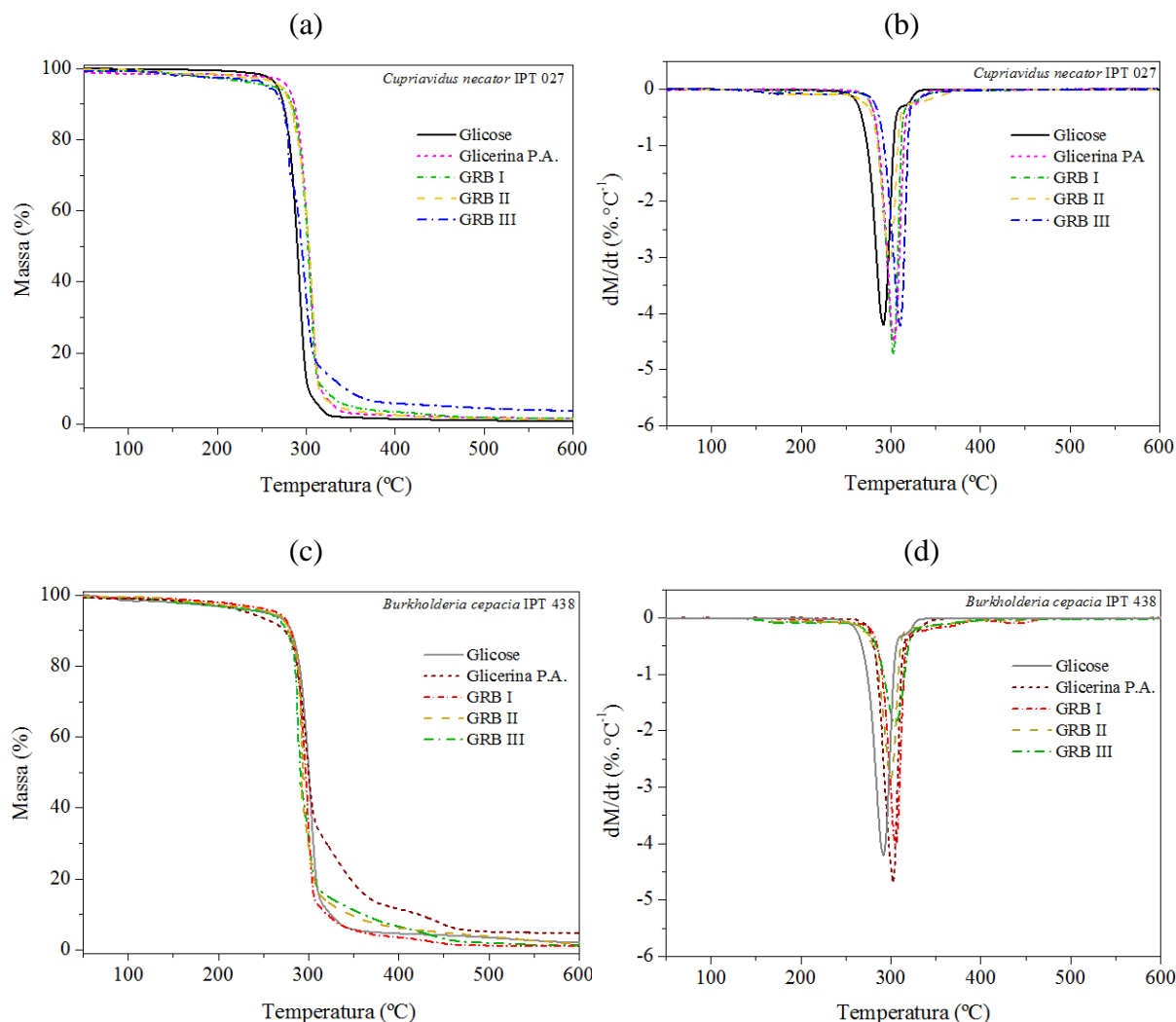
### 5.3.4 Análise Termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Os PHAs foram analisados e avaliados, termicamente, utilizando-se como parâmetros fundamentais a temperatura de fusão ( $T_m$ ) e a temperatura inicial de degradação ( $T_{on\ set}$ ) (Tabela 15, Figuras 14 e 15), uma vez que também são fatores significativos e determinantes para a aplicação industrial de biopolímeros (DROBOTH et al., 2011; CAMPOS et al., 2013).

A determinação da estabilidade térmica dos PHAs, segundo Wong et al. (2012), é fundamental para a compreensão da reciclagem química dos materiais poliméricos, e conforme Montano-Herrera et al. (2013) está relacionada a outras propriedades como massa molecular, estrutura final da cadeia e os metais residuais contidos nas amostras de biopoliésteres.

Neste sentido, mecanismos de degradação foram visualizados perante as análises termogravimétricas (Figura 14), como também demonstrado por Zhu et al. (2010), Dobroth et al. (2011) e Campos et al. (2013). Segundo García Y.G. et al. (2013), quando a degradação térmica ocorre em dois ou mais estágios de perda de massa (Figura 14), evidencia-se a presença de impurezas remanescentes do processo de extração que podem ser atribuídos a resíduos celulares.

## Capítulo 5 – Resultados e discussão



**Figura 14.** Curvas termogravimétricas (TGAs) e derivadas primeira (DTGs) dos PHAs produzidos por *Cupriavidus necator* IPT 027 (a e b) e *Burkholderia cepacia* IPT 438 (c e d) a partir de glicose, glicerina P.A., GRB I (oriunda do processamento do biodiesel de soja), GRB II (oriunda do processamento do biodiesel de óleos e gorduras residuais) e GRB III (oriunda do processamento do biodiesel de mamona).

As curvas termogravimétricas (TGAs) e suas respectivas derivadas (DTGs), mostrados na Figura 14, permitem discutir a estabilidade e a degradação térmica dos PHAs, considerando que são utilizadas para medir variações de massa de uma amostra resultante de transformações físicas (evaporação, condensação, sublimação, entre outras) ou químicas (decomposição, oxidação) em função da temperatura ou do tempo (GARCÍA Y.G. et al., 2013).

Dentre os PHAs produzidos com diferentes fontes de carbono e cepas, os mais estáveis termicamente, ou seja, com maiores temperaturas iniciais de degradação ( $T_{on\ set}$ ),

## Capítulo 5 – Resultados e discussão

foram os obtidos a partir de *Cupriavidus necator* IPT 027 com GRB I (267,6 °C) e GRB II (267,9 °C), e *Burkholderia cepacia* IPT 438 com glicerina P.A. (316,7 °C) e GRB II (275,3 °C) (Tabela 15). Os valores encontrados são comparáveis e superiores aos relatados por García I.L. et al. (2013), os quais descrevem  $T_{on\ set}$  igual a 271, 5 °C para os copolímeros de PHAs obtidos por *Cupriavidus necator* DSM545 utilizando-se glicerina residual do biodiesel como fonte principal de carbono.

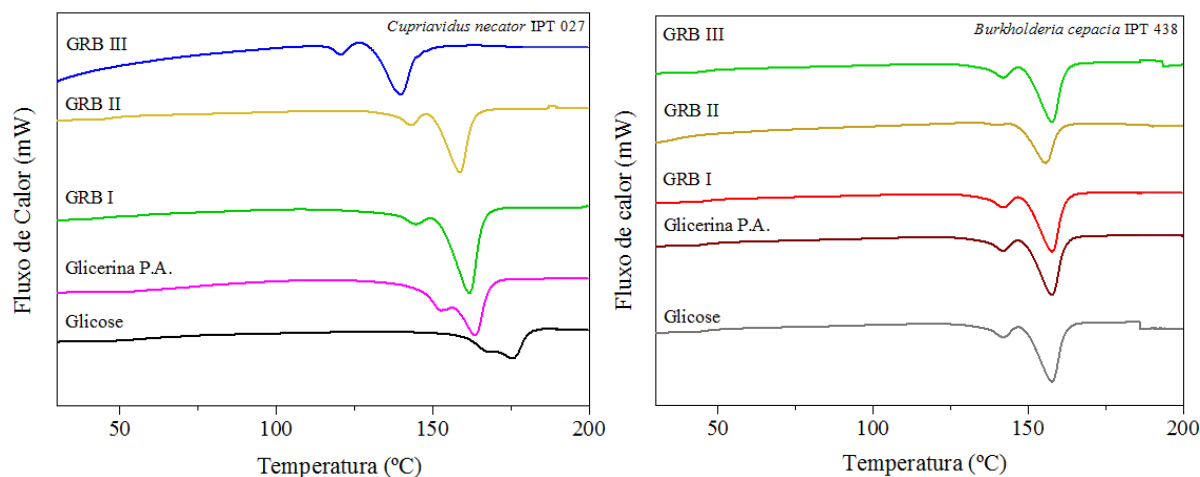
Ainda, de acordo com as curvas termogravimétricas (Figura 15), os PHAs apresentaram intervalo de perda de massa entre 95,29 % (*Burkholderia cepacia* IPT 438 com GRB III) e 98,96 % (*Cupriavidus necator* IPT 027 com GRB II). Segundo Campos et al. (2013), que obtiveram uma perda de massa máxima de 96,50 %, valores elevados de perda de massa podem indicar baixas concentrações de cinzas. Ainda com relação ao estudo termogravimétrico, as maiores perdas foram obtidas para os PHAs que se originaram de fontes de carbono com menores teores de cinzas e minerais, e vice-versa (Tabelas 8 e 13, Figura 15).

As propriedades térmicas são essenciais para a seleção de biopolímeros, destinados a diferentes aplicações (CHANPRATEEP, 2010). Os valores de  $T_m$ , entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ) e grau de cristalinidade ( $\chi_c$ ), determinadas a partir dos picos endotérmicos dos termogramas de DSC (Figura 15) também estão listados na Tabela 15. A temperatura de fusão variou entre 139,8 °C a 175,9 °C, quando *Cupriavidus necator* IPT 027 biossintetizou o polímero, com maiores variações nos valores de  $\Delta H_m$  e  $\chi_c$ . Para os PHAs armazenados por *Burkholderia cepacia* IPT 438, os valores de  $T_m$  apresentaram pequena variação (155,8 °C a 158,0 °C), assim como os valores de  $\Delta H_m$  e  $\chi_c$ . Estes fatos também permitem inferir que as GRBs influenciaram as propriedades térmicas e estruturais dos PHAs produzidos por *Cupriavidus necator* IPT 027, formando, possivelmente, biopoliésteres mais elásticos e flexíveis. Por outro lado, a utilização de GRBs, glicose ou glicerina P.A. não exercem a mesma influência nas características dos PHAs acumulados por *Burkholderia cepacia* IPT 438. Estes comportamentos obtidos para os parâmetros por DSC (Tabela 15) estão em concordância com os resultados de cristalinidade por DRX (Tabela 14).

Pohlmann et al. (2006) relatam que polímeros de PHA são instáveis acima das temperaturas de fusão, e portanto suscetível à degradação molecular, conduzindo a dificuldades no processamento do bioplástico. Deste modo geral, copolímeros de PHA são considerados termicamente estáveis em temperaturas abaixo de 160 °C, parâmetro em concordância com os valores obtidos no presente estudo (Tabela 15). Portanto, estes

## Capítulo 5 – Resultados e discussão

copolímeros podem ser moldados por injeção e aplicáveis ao processamento de filme soprado (CHANPRATEEP, 2010).



**Figura 15.** Termogramas (DSC) dos PHAs produzidos por *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438 a partir de glicose, glicerina P.A., GRB I (oriunda do processamento do biodiesel de soja), GRB II (oriunda do processamento do biodiesel de óleos e gorduras residuais), e GRB III (oriunda do processamento do biodiesel de mamona).

**Tabela 15.** Propriedades termo-físicas dos PHAs produzidos pelas cepas *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438 a partir de glicose, glicerina P.A. e GRBs I, II e III.

Fonte principal de carbono	$T_{on\ set}^3$ (°C)		$T_{decomp}^4$ (°C)		$T_m^5$ (°C)		$\Delta H_m^6$ (J/g)		$\chi_c^7$ (%)	
	027 <sup>1</sup>	438 <sup>2</sup>	027 <sup>1</sup>	438 <sup>2</sup>	027 <sup>1</sup>	438 <sup>2</sup>	027 <sup>1</sup>	438 <sup>2</sup>	027 <sup>1</sup>	438 <sup>2</sup>
Glicose	257,6 <sup>Cb</sup>	270,0 <sup>Ca</sup>	291,6 <sup>Eb</sup>	301,5 <sup>Da</sup>	175,9 <sup>Aa</sup>	157,4 <sup>Ab</sup>	84,4 <sup>Aa</sup>	56,0 <sup>Ab</sup>	57,80 <sup>Aa</sup>	38,40 <sup>Ab</sup>
Glicerina P.A.	263,8 <sup>Bb</sup>	316,7 <sup>Aa</sup>	300,8 <sup>Cb</sup>	346,7 <sup>Ca</sup>	163,0 <sup>Ba</sup>	158,0 <sup>Ab</sup>	72,5 <sup>Ba</sup>	56,5 <sup>Ab</sup>	49,70 <sup>Ba</sup>	38,70 <sup>Ab</sup>
GRB I	267,6 <sup>Aa</sup>	266,9 <sup>Da</sup>	302,6 <sup>Ba</sup>	298,5 <sup>Eb</sup>	160,1 <sup>Ca</sup>	157,7 <sup>Ab</sup>	58,1 <sup>Ca</sup>	56,8 <sup>Ab</sup>	39,80 <sup>Ca</sup>	38,90 <sup>Aa</sup>
GRB II	267,9 <sup>Ab</sup>	275,3 <sup>Ba</sup>	295,5 <sup>Db</sup>	350,9 <sup>Aa</sup>	158,3 <sup>Da</sup>	155,8 <sup>Bb</sup>	53,9 <sup>Db</sup>	56,3 <sup>Aa</sup>	36,90 <sup>Db</sup>	38,60 <sup>Aa</sup>
GRB III	217,6 <sup>Db</sup>	228,5 <sup>Ea</sup>	311,2 <sup>Ab</sup>	348,9 <sup>Ba</sup>	139,8 <sup>Eb</sup>	157,1 <sup>Aa</sup>	48,6 <sup>Eb</sup>	56,0 <sup>Aa</sup>	33,30 <sup>Eb</sup>	38,40 <sup>Aa</sup>

Médias, seguidas por distintas letras maiúsculas, na vertical mostram diferenças entre as fontes de carbono, e letras minúsculas, na horizontal mostram diferenças entre as cepas ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

GRB I = oriunda do processamento do biodiesel de soja;

GRB II = oriunda do processamento do biodiesel de óleos e gorduras residuais;

GRB III = oriunda do processamento do biodiesel de mamona;

<sup>1</sup> *Cupriavidus necator* IPT 027.

<sup>2</sup> *Burkholderia cepacia* IPT 438.

<sup>3</sup> Temperatura inicial de degradação.

<sup>4</sup> Temperatura de decomposição.

<sup>5</sup> Temperatura de fusão.

<sup>6</sup> Entalpia de fusão.

<sup>7</sup> Grau de cristalinidade.

A composição do polímero influencia, significativamente, a temperatura de fusão e flexibilidade do material (ZINN, 2003). Por conseguinte, este parâmetro pode estar

## Capítulo 5 – Resultados e discussão

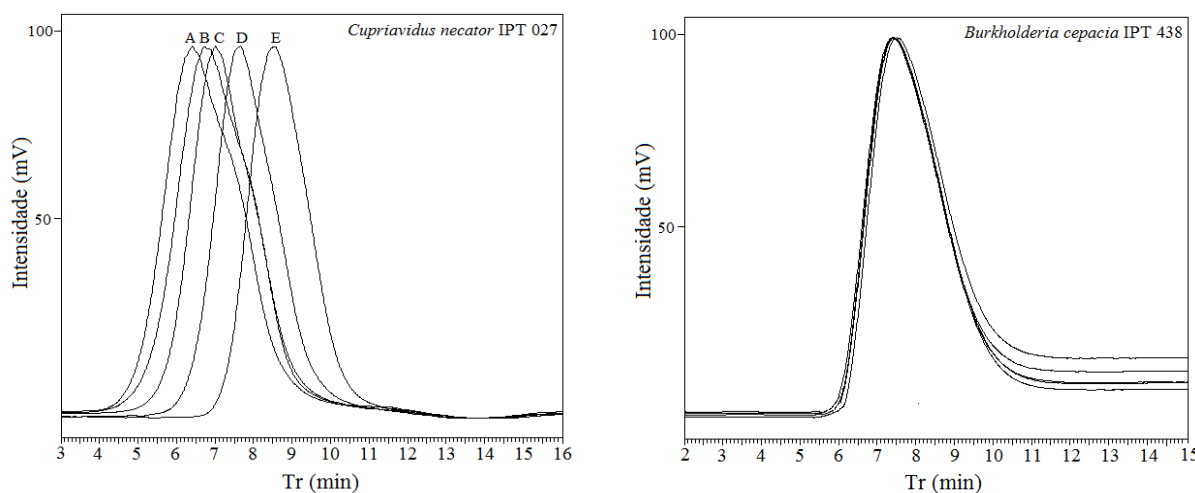
relacionado também com o comprimento da cadeia dos biopolímeros (SÍMON-COLIN et al., 2008). Deste modo, tanto a variação dos valores de  $T_m$  dos PHAs obtidos por *Cupriavidus necator* IPT 027 com as GRBs I, II e III, quanto a menor variação dos parâmetros térmicos dos PHAs produzidos por *Burkholderia cepacia* IPT 438, são justificáveis quando se comparam com as distribuições e massas moleculares dos biopolímeros (Figura 16).

### 5.3.5 Massa molecular (Mw)

A Mw dos biopolímeros foi calculada baseando-se na curva de calibração de padrões de poliestireno de diferentes Mw, conforme Equação (7).

$$\log Mw = -1,0639 \times Tr + 14,765 \text{ com } R^2 = 0,9787 \quad (\text{Eq. 7})$$

As separações das biomoléculas estão representadas em função do tempo de retenção nos cromatogramas da Figura 16, e as respectivas Mw dos PHAs estão listadas na Tabela 16.



**Figura 16.** Cromatogramas CLAE-IR dos PHAs produzidos pelas cepas *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438 a partir de GRB III (A) oriunda do processamento do biodiesel de mamona, GRB II (B) oriunda do processamento do biodiesel de óleos e gorduras residuais, GRB I (C) oriunda do processamento do biodiesel de soja; glicerina P.A. (D) e glicose (E).

Os PHAs acumulados por *Burkholderia cepacia* IPT 438 apresentaram Mw bastante similares (2020 kDa a 2390 kDa) assim como sua distribuição (Figura 16), independente da fonte principal de carbono utilizada no cultivo, evidenciando-se que a massa molecular destes

## Capítulo 5 – Resultados e discussão

biopolímeros é determinada pela bactéria. Os valores de Mw dos PHAs produzidos por esta bactéria justificam os dados de grau de cristalinidade obtidos por DRX e por DSC (Tabelas 14 e 15) uma vez que são inversamente proporcionais, com  $R^2 = 0,95$  independente do método de cálculo do parâmetro. Para os PHAs produzidos por *Cupriavidus necator* IPT 027 esta correlação, também inversamente proporcional, é obtida somente com o parâmetro obtido por DSC ( $R^2 = 0,69$ ). Isto pode indicar uma maior precisão do método DSC, uma vez que é um parâmetro absoluto enquanto o obtido por DRX é relativo.

**Tabela 16.** Massas moleculares (Mw) dos PHAs produzidos pelas cepas *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438 a partir de glicose, glicerina P.A. e GRBs I, II e III.

Fonte principal de carbono	Mw (kDa)	
	<i>Cupriavidus necator</i> IPT 027	<i>Burkholderia cepacia</i> IPT 438
Glicose	552 ± 0,21 <sup>Eb</sup>	2180 ± 0,30 <sup>Ba</sup>
Glicerina P.A.	1700 ± 0,18 <sup>Db</sup>	2110 ± 0,28 <sup>Da</sup>
GRB I	4690 ± 0,20 <sup>Ca</sup>	2020 ± 0,32 <sup>Eb</sup>
GRB II	6580 ± 0,16 <sup>Ba</sup>	2130 ± 0,26 <sup>Cb</sup>
GRB III	8240 ± 0,22 <sup>Aa</sup>	2390 ± 0,42 <sup>Ab</sup>

Médias com respectivos desvios padrão, seguidas por diferentes letras maiúsculas, na vertical mostram diferenças entre as fontes de carbono, e letras minúsculas, na horizontal mostram diferenças entre as cepas ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

GRB I = oriunda do processamento do biodiesel de soja;

GRB II = oriunda do processamento do biodiesel de óleos e gorduras residuais;

GRB III = oriunda do processamento do biodiesel de mamona.

Os PHAs sintetizados a partir da GRB III, em ambas as cepas, apresentaram massas moleculares superiores, comparando-se com as dos PHAs obtidos com as GRBs I e II, e com os PHAs obtidos com as fontes de carbono de referência (glicose e glicerina P.A.). Este fato pode ser explicado, segundo Bengtsson et al. (2010), devido à composição da fonte de carbono que pode atuar como agente de transferência de cadeia no processo de polimerização. Portanto, diferentes fontes de carbono podem dar origem a polímeros com diferentes comprimentos de cadeia, o que não se aplica aos biopoliésteres acumulados por *Burkholderia cepacia* IPT 438.

Os módulos das Mw são, quantitativamente, superiores e comparáveis aos valores obtidos por Cavalheiro et al. (2012) (550 kDa a 1370 kDa), Campos et al. (2013) (555 kDa a 780 kDa) e Mothes et al. (2007) (620 kDa a 750 kDa), os quais utilizaram, durante a produção de PHAs, meios de cultivo com gliceras residuais do biodiesel.

Laycock et al. (2013) relatam que a distribuição das massas moleculares está relacionada com as propriedades de uso final dos biopolímeros, através do controle estrutural



## Capítulo 5 – Resultados e discussão

de macromoléculas. Deste modo, para fins de aplicações industriais, o valor de Mw deve ser maior do que 600 kDa (DIONISI et al., 2005). Logo, o tipo e a concentração da fonte de carbono, a disponibilidade de nutrientes e as condições de crescimento, tais como a cepa bacteriana, o pH e a temperatura, também, são importantes no perfil das massas moleculares de PHAs resultantes (LAYCOCK et al., 2013).

Entretanto, segundo Símon-Colin et al. (2008), as diferentes Mw dos polímeros de PHAs e suas distribuições estão relacionados também a complexa organização das cadeias médias e longas dos grupamento laterais das macromoléculas, as quais impedem a formação e distribuição definida de esferulites cristalinas no material polimérico. Neste contexto, é importante determinar também a composição das unidades que compõem os polímeros.

### 5.3.6 Composição de hidroxiésteres dos copolímeros de PHAs

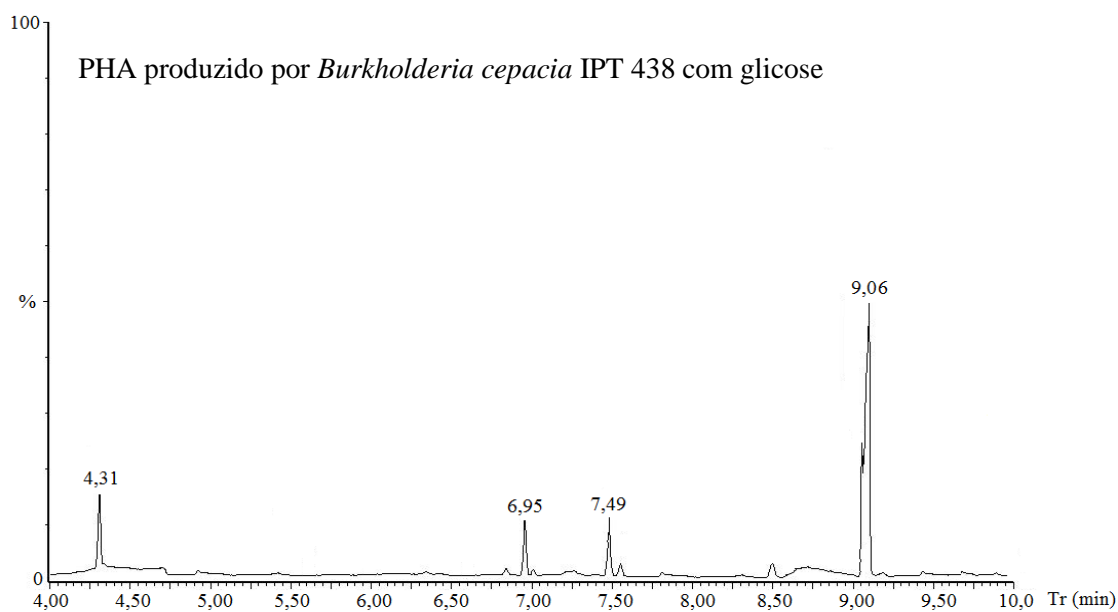
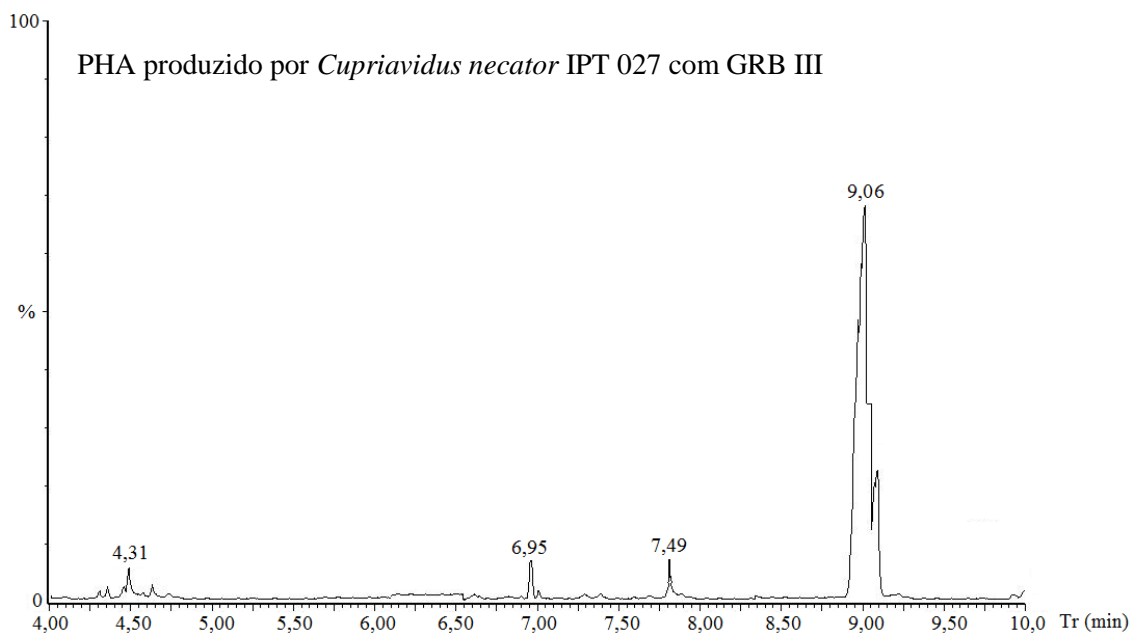
As Figuras 17 e 18 mostram os cromatogramas obtidos por CG-MS e espectros de massa de cada pico, os quais foram utilizados para identificação das unidades que compõem os PHAs produzidos por *Cupriavidus necator* IPT 027 com GRB III e por *Burkholderia cepacia* IPT 438 com glicose. A composição percentual relativa à área dos picos normalizados dos PHAs é mostrada na Tabela 17. Os copolímeros de PHA apresentaram, principalmente, quatro unidades de hidroxiésteres, com quatro a dezesseis átomos de carbono na molécula.

A composição dos copolímeros produzidos por *Cupriavidus necator* IPT 027 com GRBs destacou-se pelo predomínio de hidroxiésteres de cadeia lateral média, como o 11HHD, com variação de 51,70 %mol a 69,05 %mol, e 3HTD (5,54 %mol a 51,14 %mol). Salienta-se que a baixa temperatura de fusão (Tabela 15) e os baixos valores de cristalinidade (Tabelas 14 e 15) da maioria dos copolímeros produzidos são justificados, segundo Símon-Colin et al. (2008), pela expressiva quantidade de hidroxiésteres de cadeia lateral média, além da alta massa molecular (Tabela 16).

Campos et al. (2013) otimizaram, em biorreator, a produção de biopoliésteres a partir da cepa *Cupriavidus necator* IPT 026 com GRB II. Entretanto, os copolímeros de PHAs continham, principalmente, hidroxiésteres de cadeia lateral curta como 3-hidroxiбутирато (23,80 %mol a 56,05 %mol) e 3-hidroxiпentanoato (7,85 %mol), e PHAs de cadeia lateral

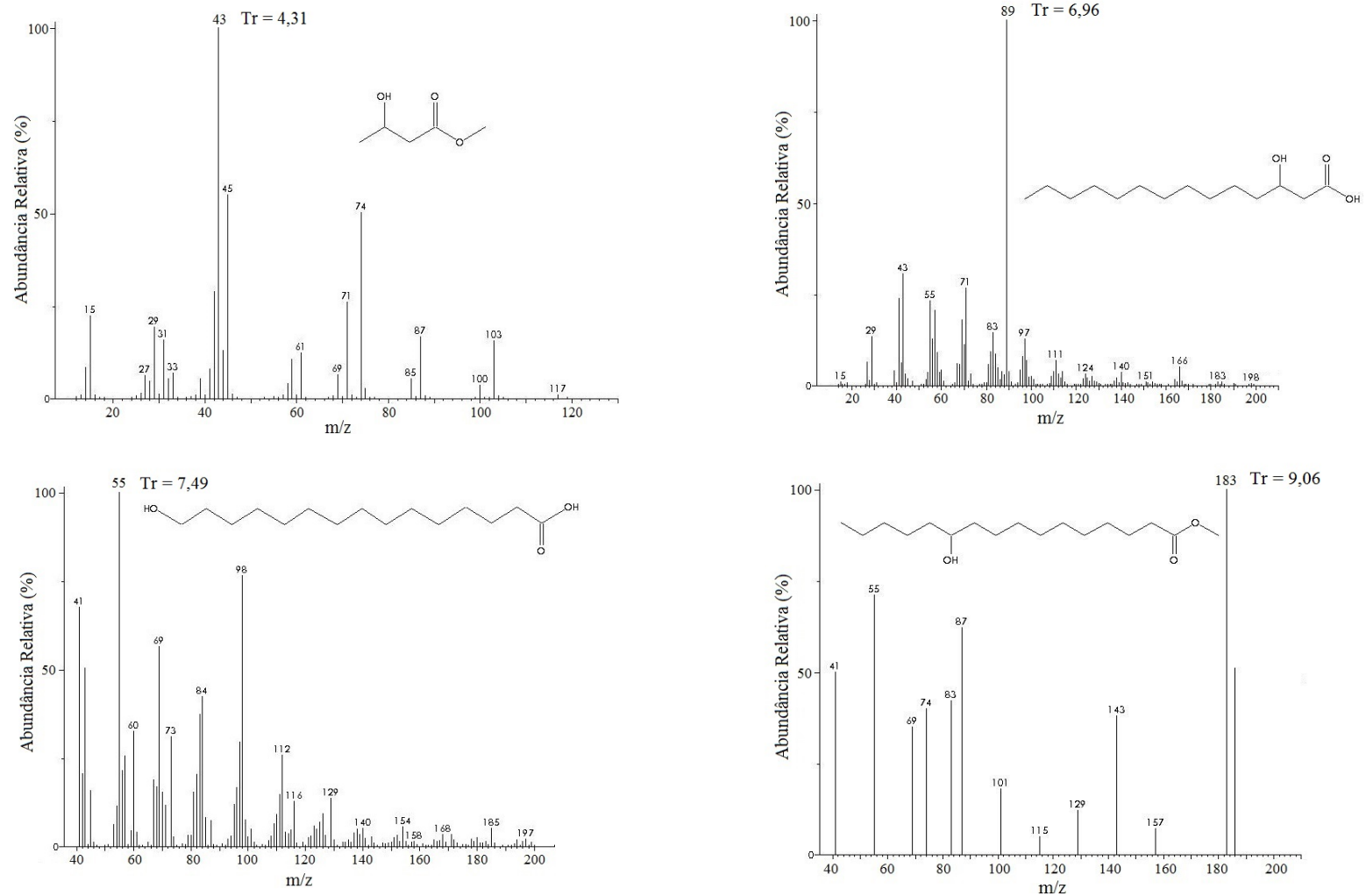
## Capítulo 5 – Resultados e discussão

média como o 8-hidroxinonanoato (27,82 % mol a 55,74 % mol). Destaca-se, deste modo, a importância da estirpe microbiana na composição e propriedades dos polihidroxialcanoatos.



**Figura 17.** Cromatogramas CG-MS: PHA produzido por *Cupriavidus necator* IPT 027 com GRB III (oriunda do processamento do biodiesel de mamona); PHA produzido por *Burkholderia cepacia* IPT 438 com glicose.

## Capítulo 5 – Resultados e discussão



**Figura 18.** Espectros de massa (NIST) de 3HB (Tr = 4,31'), 3HTD (Tr = 6,96'), 15HPD (Tr = 7,49') e 11HHD (Tr = 9,06').

## Capítulo 5 – Resultados e discussão

**Tabela 17.** Composição (%) dos PHAs produzidos pelas cepas *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438 a partir de glicose, glicerina P.A. e glicerinas GRBs I, II e III.

Unidades composição	Glicose		Glicerina P.A.		GRB I		GRB II		GRB III	
	027 <sup>1</sup>	438 <sup>2</sup>	027 <sup>1</sup>	438 <sup>2</sup>	027 <sup>1</sup>	438 <sup>2</sup>	027 <sup>1</sup>	438 <sup>2</sup>	027 <sup>1</sup>	438 <sup>2</sup>
(3HB)	12,58 <sup>Bb</sup>	14,10 <sup>Ab</sup>	9,81 <sup>Bc</sup>	12,02 <sup>Ac</sup>	14,21 <sup>Ba</sup>	23,25 <sup>Aa</sup>	9,30 <sup>c</sup>	ND	5,31 <sup>Ad</sup>	3,91 <sup>Bd</sup>
(3HTD)	51,14 <sup>Aa</sup>	11,21 <sup>Bd</sup>	22,59 <sup>Ab</sup>	14,89 <sup>Bc</sup>	13,40 <sup>Ac</sup>	11,10 <sup>Bd</sup>	12,11 <sup>Bc</sup>	24,51 <sup>Aa</sup>	5,54 <sup>Bd</sup>	15,01 <sup>Ab</sup>
(15HPD)	ND	11,47 <sup>a</sup>	ND	ND	3,29 <sup>Bc</sup>	5,12 <sup>Ab</sup>	4,98 <sup>b</sup>	ND	6,04 <sup>a</sup>	ND
(11HHD)	ND	49,53 <sup>d</sup>	51,70 <sup>Bd</sup>	54,41 <sup>Ac</sup>	53,89 <sup>Ac</sup>	42,17 <sup>Be</sup>	60,02 <sup>Ab</sup>	58,54 <sup>Bb</sup>	69,05 <sup>Aa</sup>	68,20 <sup>Ba</sup>
NI	11,04 <sup>Ad</sup>	10,66 <sup>Ad</sup>	15,90 <sup>Ba</sup>	18,68 <sup>Aa</sup>	15,21 <sup>Bab</sup>	18,36 <sup>Aa</sup>	13,59 <sup>Bc</sup>	16,95 <sup>Ab</sup>	14,06 <sup>Abc</sup>	12,88 <sup>Bc</sup>

Médias, seguidas por distintas letras maiúsculas mostram diferenças entre as cepas, para uma mesma fonte de carbono, e letras minúsculas mostram diferenças entre as fontes de carbono para uma mesma cepa ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

GRB I = oriunda do processamento do biodiesel de soja;

GRB II = oriunda do processamento do biodiesel de óleos e gorduras residuais;

GRB III = oriunda do processamento do biodiesel de mamona;

<sup>1</sup> *Cupriavidus necator* IPT 027.

<sup>2</sup> *Burkholderia cepacia* IPT 438.

3HB = 3-hidroxibutirato;

3HTD = 3-hidroxitetradecanoato;

15HPD = 15-hidroxipentadecanoato;

11HHD = 11-hidroxihexadecanoato;

ND (não detectado); NI (não identificado).

Os polihidroxialcanoatos produzidos tanto por *Cupriavidus necator* IPT 027 quanto por *Burkholderia cepacia* IPT 438, em meio de cultivo contendo GRBs, foram, estruturalmente, influenciados pelos ácidos graxos contidos nestas fontes principais de carbono, com uma grande proporção de unidades repetidas, com o mesmo número de carbonos do ácido graxo fornecido. Contudo, as subunidades contendo dois átomos de carbono a menos ou mais do que a fonte de carbono também foram detectadas em quantidades significativas nos copolímeros (Tabelas 9 e 17), o quê reflete também a utilização de ácidos graxos como fonte intermediária para a síntese de PHA (STEINBÜCHEL & LÜTKE-EVERSLOH, 2004). Além disso, pode-se constatar, matematicamente, para ambos os micro-organismos, uma relação proporcional entre a composição de ácidos graxos das GRBs e a composição de hidroxieésteres dos copolímeros de PHAs sintetizados, em que quanto maior o percentual de ácidos graxos de cadeias média e longa, maior a quantidade de hidroxieésteres de copolímeros de PHA de cadeia média. Este fato pode ser visualizado através das Equações (8) e (9).

$$A = 0,3656B + 43,283 \text{ com } R^2 = 0,9479 \quad (\text{Eq. 8})$$

$$A = 1,0447C - 18,906 \text{ com } R^2 = 0,9865 \quad (\text{Eq. 9})$$

## Capítulo 5 – Resultados e discussão

onde,

A = somatório dos percentuais de ácidos graxos de cadeias laterais média e longa das GRBs I, II e III (Tabela 8);

B = somatório dos percentuais das frações de cadeia lateral média dos PHAs produzidos por *Cupriavidus necator* IPT 027 com as GRBs I, II e III (Tabela 17);

C = somatório dos percentuais das frações de cadeia lateral média dos PHAs produzidos por *Burkholderia cepacia* IPT 438 com as GRBs I, II e III (Tabela 17).

A caracterização dos PHAs por CG-MS, permite inferir, ainda, que os micro-organismos estudados foram capazes de produzir, tanto com glicose quanto com as GRBs, copolímeros com hidroxiésteres de cadeias laterais curtas e médias. Todavia, as estirpes bacterianas tiveram, possivelmente, durante o processo de polimerização, uma adaptabilidade por hidroxiésteres com 14 ou 16 átomos de carbono, os quais estão quase sempre presentes e muitas vezes dominante, enquanto que hidroxiésteres de cadeia lateral curta são incorporados de forma menos eficiente (Tabela 17), fato também constatado por Tackor et al. (2005). Este processo justifica os hidroxiésteres de C14 e C16 presentes em PHAs, mesmo quando as células são cultivadas na presença de fontes de carbono com comprimentos de cadeia lateral curta, como a glicose.

Os hidroxiésteres identificados, principalmente o 3HB, são, perante a literatura, biodegradáveis por força das ligações de ésteres hidrolisáveis. Além disso, tais componentes evidenciam o fato de que as condições de nutrientes, cultivos e os micro-organismos modificam o comprimento da cadeia lateral (LAYCOCK et al., 2013). Deste modo, também a composição das glicerinas residuais do biodiesel influenciaram as propriedades dos biopoliésteres, comparando-se com os nutrientes, industrialmente utilizados (glicose).

## **6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS**

O potencial das glicerinas residuais do biodiesel, como fontes principais de carbono, na produção de polihidroxialcanoatos, a partir de *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Burkholderia cepacia* IPT 438, foi o destaque neste estudo. Os copolímeros produzidos e identificados por CG-MS constituíram-se de diferentes hidroxiésteres, tanto de cadeia lateral curta, como o (3HB), como de cadeia lateral média (3HTD, 15HPD e 11HHD), destacando-se a produção do copolímero 3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi tetradecanoato-co-11-hidroxi hexadecanoato em distintas variações percentuais, a depender do micro-organismo e da fonte principal de carbono. No que concerne ao processo produtivo, ambas as cepas, ao metabolizarem as glicerinas residuais do biodiesel, biossintetizaram concentrações, estatisticamente, similares de biopolímero. Já no que se refere à análise característica dos PHAs, pode-se inferir que os copolímeros produzidos por *Cupriavidus necator* IPT 027, principalmente, quando as glicerinas residuais do biodiesel foram adotadas como fontes principais de carbono, apresentaram propriedades térmicas, cristalinas e estruturais bastante interessantes em nível de aplicabilidade industrial. Entretanto, para os copolímeros de PHAs biossintetizados pela linhagem *Burkholderia cepacia* IPT 438, notou-se além de características industrialmente relevantes, uma absoluta versatilidade desta estirpe, propiciando a produção de PHAs de alta qualidade tecnológica a partir de quaisquer fontes de carbono em pesquisa. Aliado a este fato e a insignificante toxicidade, tendo-se em vista os metais investigados, os biopolímeros resultantes podem ser utilizados em distintas aplicações, não apresentando risco ao meio ambiente.

A dissertação em questão sugere para os trabalhos e estudos futuros a avaliação de determinados parâmetros e variáveis como a análise de pH, do tempo e da relação carbono/nitrogênio durante o processo de produção de polihidroxialcanoatos tanto em biorreator quanto em agitador orbital rotativo, a fim de investigar e otimizar a produção de biopolímeros no interior de células microbianas.

## Capítulo 7 – Referências

### REFERÊNCIAS

ABIPLAST. **Relatório de acompanhamento de preços de resinas termoplásticas**. 2011. Disponível em: <<http://www.simplast.com.br/pesquisas/56511298c0b9775b8f28ca27f1a281d6.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2013.

AKARAONYE, E.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v. 85, p. 732-743, 2010.

ANDREEBEN, B.; LANGE, A.B.; ROBENEK, H.; STEINBÜCHEL, A. Conversion of glycerol to poly(3-hydroxypropionate) in recombinant *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 622-626, 2010.

ANP. **Produção de Biodiesel – Metros Cúbicos**. 2011. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=46827>. Acesso em: 19 out. 2013.

AOAC (Association of Oficial Analytical Chemistis). **Oficial Methods of Analysis of AOAC International**. 16 ed., Horwitz, W. (ed.), Gaithersburg, Maryland, USA, 1997.

BABEL, W. Y.; STEINBÜCHEL, A. **Biopolyesters: special issue of advances in Biochemical Engineering Biotechnology**. 1ª ed. Berlin: Springer-Verlag, Alemanha, 342p., 2001.

BARUD, H.S.; SOUZA, J.L.; SANTOS, D.B.; CRESPI, M.S.; RIBEIRO, C.A.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S.J.L. Bacterial cellulose/poly(3-hydroxybutyrate) composite membranes. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1279-1284, 2011.

BENGTSSON, S.; PISCO, A.R.; JOHANSSON, P.; LEMOS, P.C.; REIS, M.A.M. Molecular weight and thermal properties of polyhydroxyalkanoates produced from fermented sugar molasses by open mixed cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 147, p. 172-179, 2010.

BEREZINA, N. Novel approach for productivity enhancement of polyhydroxyalkanoates (PHA) production by *Cupriavidus necator* DSM 545. **New Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 192-196, 2013.

BIOCYCLE. **História**. 2012. Disponível em: <<http://www.biocycle.com.br/site.htm>>. Acesso em: 20 dez. 2013.

BODIESELBRASIL. **Biodiesel inunda mercado no país e derruba preços**. 2007. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/glicerina-biodieselinunda-mercado-pais-derr-uba-precos-02-05-07.htm>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

BLIGH, E.G.; DYER, W. J. J. CAN. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 37, p. 911, 1957.

## Capítulo 7 – Referências

- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**, São Paulo: Edgard Blücher Ltda, v.1, 2001.
- BRANDL, H.; GROSS, R.A.; LENZ, R.W.; FULLER, R.C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1977-1982, 1988.
- BRAUNEGG, G.; SONNLEITHER, B.E.; LAFFERTY, R.M. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-b-hydroxybutyric acid in microbial biomass. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 6, p. 29-37, 1978.
- BRIGHAM, C.J.; BUDDE, C.F.; HOLDER, J.W.; ZENG, Q.; MAHAN, A.E.; RHA, C.; SINSKEY, A.J. Elucidation of  $\beta$ -oxidation pathways in *Ralstonia eutropha* H16 by examination of global gene expression. **Journal Bacteriology**, v. 192, n. 20, p. 5454-5464, 2010.
- BRITO, G.F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E.M.; MÉLO, T.J.A. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, n. 6, p. 127-139, 2011.
- BRUNEL, D.G. **Influência da Incorporação de Aditivos nas Propriedades do Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato - PHBV)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia dos Materiais, São Carlos, São Paulo, Brasil, 181p., 2008.
- CAMPBELL, D.; WHITE, J.R. **Polymer Characterization**. London: Chapman & Hall, 1989.
- CAMPOS, M.I.; COSTA, L.A.S.; RIBEIRO, P.L.L.; ASSIS, D.J.; FIGUEIREDO, T.V.B.; DRUZIAN, J.I. Produção e caracterização de polihidroxialcanoatos por fermentação da glicerina residual do biodiesel. **In: 12º CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS**, 2013, Florianópolis. **Anais...** Santa Catarina: CBPOL, p. 1-4, 2013.
- CANEVAROLO, S. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. São Paulo: Artliber, 448p., 2002.
- CARDOZO, J.R.G. **Producción y caracterización de polihidroxialcanoatos, sintetizados por microorganismos nativos a partir de residuos grasos**. Dissertação de Mestrado, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Medellín, Colombia, 128p., 2013.
- CARMINATTI, C.; MESSANE, F.E.; BRANDÃO, M.C.Z.; PINHEIRO, V.R. **Produção de polihidroxialcanoatos (PHAs)**. Trabalho de Graduação em Engenharia Bioquímica. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 25p., 2006. Disponível em:<[http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc\\_eng\\_bioq/trabalhos\\_grad/trabalhos\\_grad\\_2006-1/pha.pdf](http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_grad/trabalhos_grad_2006-1/pha.pdf)>. Acesso em: 20 jun. 2013.
- CATONI, S.E.M. **Biossíntese e obtenção de PHB e PHBV plastificados com PEG visando**



## Capítulo 7 – Referências

**aplicação em liberação controlada de fármacos.** Dissertação de Mestrado. Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Departamento de Engenharia de Processos, Joinville, Santa Catarina, Brasil, 87p., 2011.

CATONI, S.E.M.; TRINDADE, K.N.; GOMES, C.A.T.; SCHNEIDER, A.L.S.; PEZZIN, A.P.T. Influence of Poly(Ethylene Glycol) – (PEG) on the Properties of Influence of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) – PHBV. **Polímeros**, v. 23, n. 3, p. 320-325, 2013.

CAULKINS, J.C.A. **Identificação de genes envolvidos na síntese de polihidroxicanoatos em *Burkholderia cepacia* linhagem IPT 64.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, Brasil, 114p., 2008.

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**, v. 44, n. 5, p. 509-515, 2009.

CAVALHEIRO, J.M.B.T.; RAPOSO, R.S.; DE ALMEIDA, M.C.M.; CESÁRIO, M.T.; SEVRIN, C.; GRANDFILS, C.; DA 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.

CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 621-632, 2010.

CHÁVEZ, J. D. **Aproveitamento biotecnológico do glicerol derivado da produção de biodiesel para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos.** Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Departamento de Biotecnologia Industrial, Lorena, São Paulo, Brasil, 125p., 2008.

CHEE J.Y.; YOGA S.; LAU N.; LING S.; RAEID M.; ABED M.; SUDESH K. Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (PHA): Converting renewable resources into bioplastics. Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. A Mendez-vilas edition, **Formatex**, 2010.

**City of Orilla Biodegradable Bag Study.** Solid Waste Management Division, 2003.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia.** São Paulo: Editora da UNICAMP, 453p., 2006.

COUTINHO, B.C.; MIRANDA, G.B.; SAMPAIO, G.R.; de SOUZA, L.B.S.; SANTANA, W.J.; COUTINHO, H.D.M. A importância e as vantagens do polihidroxicanoato (plástico biodegradável). **Holos**, v. 20, p. 76-81, 2003.

DABDOUB, M.J.; BRONZEL, J.L.; RAMPIN, M.A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 776-792, 2009.

DALCANTON, F. **Produção, extração e caracterização de poli(3-hidroxibutirato) por**

## Capítulo 7 – Referências

- Ralstonia eutropha* em diferentes substratos.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia de Alimentos, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 150p., 2006.
- DASARI, M.A.; KIATSIMKUL, P.P.; SUTTERLIN, W.R.; SUPPES, G.J. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A: General**, v. 281, n. 2, p. 225-231, 2005.
- DOBROTH, Z.T., HU, S., COATS, E.R., MCDONALD, A. Polyhydroxybutyrate synthesis on biodiesel wastewater using mixed microbial consortia. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3352-3359, 2011.
- FECHINE, G. J. M. **A era dos polímeros biodegradáveis.** Plástico Moderno. n. 423, p. 28-38, 2010.
- FERREIRA, G.M. **Estudo das propriedades reológicas do sistema polpa de cupuaçu – biopolímeros.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, Brasil, 120p., 2008.
- FERREIRA, M. O. **Purificação da glicerina bruta obtida a partir da transesterificação do óleo de algodão.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Engenharia Química, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil, 127p., 2009.
- FONSECA, G.G. **Produção de polihidroxicanoatos por *Escherichia coli* recombinante.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 178p., 2003.
- FORMOLO, M.C.; DUARTE, M.A.T.; SCHNEIDER, A.L.; FURLAN, S.A.; PEZZIN, A.P.T. Polihidroxicanoatos: biopoliésteres produzidos a partir de fontes renováveis. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 4, n. 2, p. 14-21, 2003.
- FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis: uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.
- FRIEDRICH, S.A. **Worldwide review of the commercial production of biodiesel.** A Technological, economic and ecological investigation based on case studies. Institute for Technology and Sustainable Product Management, Áustria, 2004.
- GALEGO, N.; ROZSA, C.; SÁNCHEZ, R.; FUNG, J.; VÁSQUEZ, A.; TOMÁS, J.S. Characterization and application of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials. **Polymer Testing**, v. 19, p. 485-492, 2000.
- GANCEDO, C; GANCEDO, J.M; SOLS, A. Glycerol Metabolism in Yeasts. **Journal of Biochemistry**, v. 6, n. 2, p. 165-172, 2001.
- GARCÍA, I.L.; LÓPEZ, J.A.; DORADOA, M.P.; KOPSAHELIS, N.; ALEXANDRI, M.;

## Capítulo 7 – Referências

PAPANIKOLAOU, S. Evaluation of by-products from the biodiesel industry as fermentation feedstock for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Cupriavidus necator*. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 16-22, 2013.

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.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia de Alimentos, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 158p., 2006.

GARCÍA, Y.G.; MEZA, J.C.C.; REYNOSO, O.G.; LÓPEZ, J.A.C. Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano. **Revista Internacional Contaminación Ambiental**, v. 29, n. 1, p. 77-115, 2013.

GLAZER, A.N.; NIKAIDO, H. H. **Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology**, 2ª ed., New York: Cambridge University Press, 577p., 2007.

**GLICERINA** – Sub-produto do biodiesel. 2010. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/glicerina/biodiesel-glicerina.htm>>. Acesso em: 5 out. 2013.

HIROE, A.; USHIMARU, K.; TSUGE, T. Characterization of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase derived from *Delftia acidovorans* DS-17 and the influence of PHA production in *Escherichia coli*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 6, p. 633-638, 2013.

HORNG, Y.T.; CHIEN, C.C.; HUANG, C.T.; WEI, Y.H.; CHEN, S.Y.; LAN, J.C.W.; P.-C. SOO, P.C. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with co-expressed propionate permease (prpP), beta-ketothiolase B (bktB), and propionate-CoA synthase (prpE) in *Escherichia coli*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 73-79, 2013.

HUANG, D.H.; LU, X.Z.; XIONG, S.J. HAO, L.P. Microorganism screening for PHAMCL accumulation from activated sludge and its characteristics. **Journal Agro-Environment Science**, v. 25, p. 517-521, 2006.

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.

JOHNSON, D.T; TACONI, K.A. The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. **Environmental Progress**, v. 26, n. 4, p. 339, 2007.

JOSEPH, J. D.; ACKMAN, R. G. Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 75, p. 488-506, 1992.

KAWATA, Y.; AIBA, S. Poly(3-hydroxybutyrate) production by isolated *Halomonas* sp., KM-1 using waste glycerol. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 74, p. 175-177, 2010.

## Capítulo 7 – Referências

- KEENAN, T.M.; NAKAS, J.P.; Y TANENBAUM, S.W. Polyhydroxyalkanoate copolymers from forest biomass. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 33, p. 616-626, 2006.
- KHAN, N.T.; BIBI, M.; YOUSUF, S.; QURESHI, I.H.; ATTA-UR-RAHMAN; AL-MAJID, A.M.; MESAİK, M.A.; KHALID, A.S.; SATTAR, S.A.; ATIA-TUL-WAHAB; CHOUDHARY, M.I. Synthesis of some potent immunomodulatory and anti-inflammatory metabolites by fungal transformation of anabolic steroid oxymetholone. **Chemistry Central Journal**, v. 6, n. 153, p.2012.
- KHOSRAVI-DARANI, K.; MOKHTARI, Z.B.; AMAI, T.; TANAKA, K. Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C<sub>1</sub> carbon sources. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 4, p. 1407-1424, 2013.
- KIM, B.S. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 27, p. 774-777, 2000.
- KRUEGER, C.L. **Seleção de linhagens de Bacillus produtoras de polihidroxialcanoatos a partir de resíduo do processamento de mandioca**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Departamento de Engenharia de Alimentos, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 104p., 2009.
- KUMAR, M.; MOHANTY, S.; NAYAK, S. K.; PARVAIZ, M. Effect of glycidyl methacrylate (GMA) on the thermal, mechanical and morphological property of biodegradable PLA/PBAT blend and its nanocomposites. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 21, p. 8406-8415, 2010.
- LAYCOCK, B.; HALLEY, P.; Pratt, S.; WERKER, A.; LANTA, P. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. **Progress in Polymer Science**, v. 48, p. 1-48, 2013.
- LEE, S.Y.; CHOI, J. Effect of fermentation performance on the economics of poly(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1, p. 431-438, 1997.
- LEMO, J. B.; OLIVEIRA, C.; OLIVEIRA, S.; REICHE, A. **Fungos Filamentosos: Agentes de Degradação de Petróleo e de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos**. Série Tecnológica Ambiental. 56p., 2008.
- LENZ, R.W.; MARCHESSAULT, R.H. Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable, plastics and biotechnology. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2005.
- LI, X.; ZHANG, Y.; CHEN, G. Nanofibrous polyhydroxyalkanoate matrices as cell growth supporting materials. **Biomaterials**, v. 29, p. 3720-3728, 2008.
- LOCATELLI, G.O. **Estudo das condições de hidrólise da pectina para uso como substrato na produção de polihidroxialcanoatos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Biotecnologia Industrial, Recife, Pernambuco,

## Capítulo 7 – Referências

Brasil, 120p., 2012.

LÜTKE-EVERSLOH, T.; STEINBÜCHEL, A. Microbial polythioesters. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, n. 3, p.165-174, 2004.

LUVIZETTO, D.J. **Cultivo da bactéria *Bacillus megaterium* para a produção do biopolímero poli(3-hidroxiobutirato) e modelagem matemática do bioprocesso.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Engenharia Química, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 119p., 2007.

MADISON, L.L.; HUISMAN, G.W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, n. 1, p. 21-53, 1999.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Polímeros**. 2ª ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1999.

MARANGONI, C. **Estudo de estratégias de produção de poli(3-hidroxiobutirato-co-3-hidroxi valerato) por *Ralstonia eutropha* utilizando substrato de baixo custo e ácido propiônico.** Florianópolis. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia de Alimentos, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 101p., 2000.

MELO, E.G.V. **Avaliação da glicerina bruta na estimulação de bactérias hidrocarbonoclasticas para remediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia, Instituto de Geociências, Salvador, Bahia, Brasil, 68p., 2011.

MENDES, D.B.; SERRA, J.C.V. Glicerina: uma abordagem sobre a produção e o tratamento. **Revista Liberato**, v. 13, n. 20, p. 01-134, 2012.

MENEGUETTI, S.P. **Alternativas para ampliar os usos e o Mercado da glicerina.** BiodieselBR.com. 2006. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/colunistas/meneghetti/alternativas-ampliar-usos-mercado-glicerina.htm>>. Acesso em: 20 abr. 2013.

MENEZES-FILHO, J.A.; PAES, C.R.; PONTES, A.M.C.; MOREIRA, J.C.; SARCINELLI, P.N.; MERGLER, D. High levels of hair manganese in children living in the vicinity of a ferro-manganese alloy production plant. **NeuroToxicology**, v. 30, p. 1207-1213, 2009.

MIESIAC, I.; ROGALINSKI, A.; JOZWIAK, P. Transesterification of triglycerides with ethyl acetate. **Fuel**, v. 105, p. 169-175, 2013.

MONTANO-HERRERA, L.; PRATT, S.; ARCOS-HERNANDEZ, M.V.; HALLEY, P.J.; LANT, P.A.; WERKER, A.; LAYCOCK, B. In-line monitoring of thermal degradation of PHA during melt-processing by Near-Infrared spectroscopy. **New Biotechnology**, v. 00, n. 00, 2013.

MOTA, C.J.A. **Novos produtos e processos a partir da glicerina de produção do biodiesel.** 2010. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/revista/011/direito-do>>

## Capítulo 7 – Referências

laboratorio-11.htm.>. Acesso em: 28 dez. 2013.

MOTA, C.J.A.; da SILVA, C.X.A.; GONÇALVES, V.L.C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 639-648, 2009.

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

NARANJO, J. M.; POSADA, J. A.; HIGUITA, J. C.; CARDO, C. A. Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 38-44, 2013.

NARAYAN, R.; S. MOJO. No Year Given. **Summary of ASTM D6400-99 Test Method and Specifications & Correlation of Test Methods to Reral World Composting Results**. International Biodegradable Products Institute, 1999.

NASCIMENTO, J.F. **Estudo da processabilidade e da caracterização do poli(ácido 3-hidrobutírico) – PHB obtido a partir de cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Departamento de Engenharia de Alimentos, Campinas, São Paulo, Brasil, 74p., 2001.

PACHEKOSKI, W.M.; AGNELLI, J.A.M. Blendas de poli-hidroxibutirato (PP) com polipropileno (PP). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS, 14. **Livro de Resumos**, São Pedro, São Paulo, p. 184, 2000.

PAN, W.; NOMURA, C.T.; NAKAS, J.P. Estimation of inhibitory effects of hemicellulosic wood hydrolysate inhibitors on PHA production by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 275-282, 2012.

PEREZ, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Revista Biológica**, v. 64, n. 2, p. 227-229, 2002.

POHLMANN, A.; FRICKE, W. F.; REINECKE, F.; KUSIAN, B.; LIESEGANG, H.; CRAMM, R.; EITINGER, T.; EWERING, C.; PÖTTER, M.; SCHWARTZ, E. Genome sequence of bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 1257-1262, 2006.

POLI, A.; DONATO, P.D.; ABBAMONDI, G.R.; NICOLAUS, B. Synthesis, Production, and Biotechnological Applications of Exopolysaccharides and Polyhydroxyalkanoates by Archaea. Hindawi Publishing Corporation, **Archaea**, v. 2011, p. 1-13, 2011.

PORWAL, S.; KUMARA, T.; LAL, S.; RANI, A.; KUMAR, S.; CHEEMA, S.; PUROHITD, H.; SHARMA, R.; PATEL, S.; Y KALIA, V.C. Hydrogen and polyhydroxybutyrate producing abilities of microbes from diverse habitats by dark fermentative process. **Bioresource Technology**, v. 13, p. 5444-5451, 2008.

POSADA, J.A.; NARANJO, A.J.M.; LÓPEZB, J.A.; HIGUITAA, J.C.; CARDONAA, C.A..

## Capítulo 7 – Referências

Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 310-317, 2011.

QUILLAGUAMÁN, J.; GUZMÁN, H.; VAN-THUOC, D.; HATTI-KAUL, R. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by *Halophiles*: current potential and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1687-1696, 2010.

RABERG, M.; PEPLINSKI, K.; HEISS, S.; EHRENREICH, A.; VOIGT, B.; DÖRING, C.; BÖMEKE, M.; HECKER, M.; STEINBÜCHEL, A. Proteomic and transcriptomic elucidation of the mutant *Ralstonia eutropha* G+1 with regard to glucose utilization. **Applied Environmental Microbiology**, v. 77, n. 6, p. 2058-2070, 2011.

REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; KALIA, V.C. Polyhydroxyalkanoates: na overview. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 137-146, 2003.

REHM, B. H. A.; STEINBÜCHEL, A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, n. 3, p. 3-19, 1999.

RIVALDI, J.D.; SARROUH, B.F.; FIORILO, R.; SILVA, S.S. Glicerol de biodiesel. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 37, p. 44-51, 2007.

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

ROCHA JÚNIOR, P.R. de S. **Estudo das condições de cultivo para a produção de PHB por *Cupriavidus necator* em fermentação no estado sólido**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Bioquímica, Rio de Janeiro, Brasil, 118p. 2005.

RODRIGUES AUGUSTO, C. **Validação de metodologia analítica para a determinação da composição química do gás natural por cromatografia em fase gasosa aliada à estimativa dos parâmetros da precisão através da comparação laboratorial**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, Brasil, 158p., 2011.

RODRIGUES, A.D. **Estudo da produção de polihidroxiálcanoato por *Cupriavidus necator* em fermentação no estado sólido**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Departamento de Engenharia Química, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 87p., 2005.

RODRIGUES, M.F.; VALENTIN, H.E.; BERGER, P.A.; TRAN, M.; ASRAR, J.; GRUYS, K.J.; STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoate accumulation in *Burkholderia* sp.: a molecular approach to elucidate the genes involved in the formation of two homopolymers consisting of short-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 53, n. 4, p. 453-460, 2000.

SANTOS, P.S. **Ciência e Tecnologia de Argilas**. 2ª ed. São Paulo: Edgard Blücher, 408p.,

## Capítulo 7 – Referências

1989.

SARANYA, V.; SHENBAGARATHAI, R. Production and characterization of pha from recombinant *e. coli* harbouring *phaC1* gene of indigenous *Pseudomonas* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 164-167, 2011.

SCHMAEDECKE, C.M. **Produção de ácido gama-poliglutâmico através do aproveitamento de soro de leite de glicerol residual do biodiesel**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Grande do Sul, Departamento de Engenharia de Alimentos, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 55p., 2010.

SCHMIDT, M. **Produção de poli(3-hidroxi-butirato) por *Cupriavidus necator* DSM 545 em meio suplementado com óleo de soja miniemulsionado**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Alimentos, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 125p., 2011.

SCOTT, G. Green Polymers. **Polymer Degradation and Stability**, v. 68, p. 1-7, 2000.

SEVIOUR, R.J.; MINO, T.; ONUKI, M. The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 99-127, 2003.

SHAHID, S.; MOSRATI, R.; LEDAUPHIN, J.; AMIEL, C.; FONTAINE, P.; GAILLARD, J.; CORROLER, D. Impact of carbon source and variable nitrogen conditions on bacterial biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Evidence of an typical metabolism in *Bacillus megaterium* DSM 509. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 3, p. 302-308, 2013.

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 e OLIVEIRA, J.; ANTONIASSI, R.; de FREITAS, S.C.; MÜLLER, M.D. Composição química da glicerina produzida por usinas de biodiesel no Brasil e potencial de uso na alimentação animal. **Ciência Rural**, v. 43, n. 3, p. 509-512, 2013.

SILVA, E.M.; COUTINHO, M.G.F.; COSTA, R.B.; CARVALHO, L.H. de; CANEDO, E.L. Effect of loading level and clay purification on the structure and water vapor permeability of LLDPE/bentonite nanocomposites. **Polímeros**, v. 23, n. 1, p. 108-114, 2012.

SILVA, J.B.A. **Preparação e caracterização de filmes flexíveis de amido e de PBAT/Amido termoplástico reforçados com nanowhiskers por casting e extrusão**. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Bahia. Departamento de Engenharia Química, Salvador, Bahia, Brasil, 200p., 2013.

SILVA, L.C.A. **Obtenção e caracterização de nanocompósitos à base de polihidroxicanoato/atapulgita**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Engenharia dos Materiais, São Cristóvão, Sergipe, Brasil, 70p., 2010.

SILVA, L.F. TACIRO, M.K.; PRADELLA, J.G.C. Fábrica viva de plástico biodegradável.



## Capítulo 7 – Referências

**Ciência Hoje**, v. 29, n. 174, p. 69-71, 2001.

SILVA, L.F.; GOMEZ, J.G.C. Produção biotecnológica de poli-hidroxicanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1732-1743, 2007.

SILVA, M.B.R.; TAVARES, M.I.B.; NETO, R.P.C. Dynamic and structural evaluation of poly(3-hydroxybutyrate) layered nanocomposites. **Polymer Testing**, v. 32, p.165-174, 2013.

SÍMON-COLIN, C.; RAGUÉNÈS, G.; COSTA, B.; J. GUEZENNEC. Biosynthesis of medium chain length poly-3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas guezenei* from various carbon sources. **Reactive & Functional Polymers**, v. 68, p. 1534-1541, 2008.

SOUZA, P.P.; SILVA, G.G.; AMARAL, L.O.F. Transição Vítrea. **Química Nova**, v. 20, 2004.

SPIER, V. C. **Caracterização espectroscópica e cromatográfica de copolímeros biodegradáveis**. Dissertação de Mestrado, Universidade do Estado de Santa Catarina, Departamento de Engenharia de Materiais, Joinville, Santa Catarina, Brasil, 2005.

SPOLJARIC, I.V.; LOPAR, M.; KOLLER, M.; MUHR, A.; SALERNO, A.; REITERER, A.; MALLI, K.; ANGERER, H.; STROHMEIER, K.; SCHÖBER, S.; MITTELBACH, M.; HORVAT, P. Mathematical modeling of poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] synthesis by *Cupriavidus necator* DSM 545 on substrates stemming from biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 482-494, 2013.

STEINBÜCHEL, A.; FUCHTENBUSCH, B. Bacterial and other biological systems for polyester production. **Trends Biotechnology**, v. 16, p. 419-427, 1998.

STEINBÜCHEL, A.; LÜTKE-EVERSLOH, T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v.16, p.81-96, 2004.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, v. 25, n. 10, p. 1503-1555, 2000.

SURIYAMONGKOL, P.; WESELAKE, R.; NARINE, S.; MOLONEY, M.; SHAH, S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants- review. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 148-175, 2007.

TACKOR, N.; TRIVEDI, U.; PATEL, K.C. Biosynthesis of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl-PHAs) by *Comamonas testosteroni* during cultivation on vegetable oils. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1843-1850, 2005.

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

## Capítulo 7 – Referências

2012.

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.

TSUGE, T.; WATANABE, S.; SATO, S.; HIRAIISHI, T.; ABE, H.; DOI, Y.; TAGUCHI, S. Variation in copolymer composition and molecular weight of polyhydroxyalkanoate generated by saturation mutagenesis of *Aeromonas caviae* PHA synthase. **Macromolecular Bioscience**, v. 7, n. 6, p. 846-854, 2007.

VANDAMME, E.J.; DE BAETS, S.; STEINBUHEL, A. Biopolymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, p. 265-266, 2005.

VANEECHOUTTE, M.; KAMPFER, P.; DE BAERE, T.; FALSSEN, E.; VERSCHRAEGEN, G. *Wautersia gen. nov.*, a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia [Pseudomonas] syzygii*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 317-327, 2004.

VAN-THUOC, D.; QUILLAGUAMÁN, J.; MAMO, G.; MATTIASSON, B. Utilization of agricultural residues for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 420-428, 2008.

VANZIN, C. **Estudo da biossíntese de poli-3-hidroxibutirato-co-hidroxialcanoatos de cadeia média (P3HB-co-3HAMcl) a partir de ácidos graxos livres e óleo vegetal**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Instituto de Biotecnologia, São Paulo, Brasil, 202p., 2008.

VIANA, G.F.; GARCIA, K.S.; MENEZES-FILHO, J.A. Assessment of carcinogenic heavy metal levels in Brazilian cigarettes. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 181, n. 4, p. 255-265, 2011.

VIVEIROS, M. **Bagaço vira plástico biodegradável**. Folha de São Paulo, São Paulo, 02 de novembro de 2002. Disponível em: <<http://www.ipt.br/imprensa/midia/?ID=962>>. Acesso em: 9 dez. 2013.

VONK, C.G. Computerization of Ruland's X-ray method for determination of the crystallinity in polymers. **Journal of Applied Crystallography**, v. 6, p. 148-152, 1973.

WANG, B.; SHARMA-SHIVAPPA, R.R.; OLSON, J.W.; KHAN, S.A. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Alcaligenes latus* using sugarbeet juice. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 802-811, 2013.

WONG, Y.; BRIGHAM, C.J.; RHA, C.; SINSKEY, A.J.; SUDESH, K. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate containing high 3-hydroxyhexanoate monomer fraction from crude palm kernel oil by recombinant *Cupriavidus necator*. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 320-327, 2012.

## Capítulo 7 – Referências

- 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, H.X.; ZHOU, M.S. Synthesis of some potent immunomodulatory and anti-inflammatory metabolites by fungal transformation of anabolic steroid oxymetholone. **Polymer**, v. 50, p. 1533-1540, 2009.
- YAZDANI, S.S.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinions on Biotechnology**, v. 18, p. 213, 2007.
- YU, J.; SI, Y. A dynamic study and modeling of the formation of polyhydroxyalkanoates combined with treatment of high strength wastewater. **Environmental Science and Technology**, v. 35, p. 3584–3588, 2001.
- ZACARIA, M.R.; ARIFFINA, H.; JOHAR, N.A.M.; ABD-AZIZ, S.; NISHIDA, H.; SHIRAI, Y.; HASSANA, M.A. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer from wild-type *Comamonas* sp. EB172. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, p. 1382-1386, 2010.
- ZHU, C.; NOMURA, C.T.; PERROTA, J.; STIPANOVIC, A.J.; NAKAS, J.P. Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from biodiesel-glycerol by *Burkholderia cepacia* ATCC17759. **Biotechnology Progress**, v. 26, p. 424-430, 2010.
- ZHU, C.; NOMURA, C.T.; PERROTA, J.A.; STIPANOVIC, A.J.; NAKAS, J.P. The effect of nucleating agents on physical properties of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (PHB-co-HV) produced by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759. **Polymer Testing**, v. 31, p. 579-585, 2012.
- ZINN, M. Tailor-made synthesis of polyhydroxyalkanoate. **European Cells and Materials**, v. 5, p. 38-39, 2003.
- ZINN, M.; WITHOLT, B.; EGLI, T. Dual nutrient limited growth: models, experimental observations, and applications. **Journal Biotechnology**, v. 113, p. 263-279, 2004.