



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

MÁRCIO INOMATA CAMPOS

**POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) OBTIDOS A PARTIR DA GLICERINA
BRUTA RESIDUAL DO BODIESEL (GBRB): PRODUÇÃO, OTIMIZAÇÃO,
CINÉTICA E PROPRIEDADES**

Salvador
2013

MÁRCIO INOMATA CAMPOS

**POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) OBTIDOS A PARTIR DA GLICERINA
BRUTA RESIDUAL DO BIODIESEL (GBRB): PRODUÇÃO, OTIMIZAÇÃO,
CINÉTICA E PROPRIEDADES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Janice Izabel Druzian
Co-Orientadora: Profa. Dra. Nadia Mamede José

Salvador
2013

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA TESE DE DOUTORADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA UFBA – CAMPUS DA ESCOLA POLITÉCNICA.



UFBA

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



EPUFBA

A Comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese "POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) OBTIDOS A PARTIR DA GLICERINA BRUTA RESIDUAL DO BIODIESEL (GBRB): PRODUÇÃO, OTIMIZAÇÃO, CINÉTICA E PROPRIEDADES" de Márcio Inomata Campos como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química.

Salvador Ba, 08 de novembro de 2013.

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Janice Izabel Druzian
(Orientadora-UFBA)

Profa. Dra. Francine Ferreira Padilha
(UNIT)

Prof. Dr. Jaime Soares Boaventura Filho
(UFBA)

Prof. Dr. Arnoud Victor dos Santos
(UNEB)

Prof. Dr. Giovani Brandão Mafra de Carvalho
(UEFS)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por ter iluminado meu caminho ao longo desta trajetória e pela oportunidade de ter contado com a colaboração de todas as pessoas as quais listo abaixo.

A minha família, Midore, Márcia, Cintian, Kaori, Sayuri e Stéfane, pelo carinho, apoio e compreensão em todos os momentos.

A minha orientadora Profa. Janice Izabel Druzian, por sempre ter acreditado no meu potencial, estimulando a conquista de muitas vitórias, acompanhando com paciência, competência, compromisso e dedicação a elaboração deste trabalho.

Aos amigos do LAPESCA Larissa, Denilson, Paulo, Luciane, Carol, Jânia, Gleice e Jaff, que diretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho, muito obrigado pelo companheirismo, pelos ensinamentos e pela boa vontade de todos.

A Tamiris que sempre esteve próxima e que de forma muito corajosa, encarou comigo todos os desafios impostos nesta jornada.

À UFBA e ao PPEQ pela oportunidade de realizar o doutorado e a Faculdade de Farmácia – LAPESCA pela infra-estrutura que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao projeto NANOBIOTEC 13 - CAPES pelo apoio financeiro e bolsa concedida.

Agradeço aos demais, os quais é difícil citar todos, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e para o meu amadurecimento profissional.

RESUMO GERAL

A diversidade de utilização de materiais poliméricos acarreta preocupação devido a utilização de fonte não renovável para a sua produção, bem como à problemas ambientais causados pelo acúmulo do volume de lixo sólido gerado. Procurando minimizar este problema buscaram-se alternativas de produtos semelhantes aos plásticos de origem petroquímica, uma delas são os polímeros biodegradáveis. Os polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres sintetizados por microrganismos como substâncias naturais de reserva de carbono e energia, sendo acumulados pela célula microbiana na forma de grânulos intracelulares, podendo representar até 80% da massa seca celular. O presente trabalho teve como objetivo produzir polihidroxicanoatos (PHAs) a partir da fermentação da glicerina bruta residual do biodiesel (GBRB), utilizando *Cupriavidus necator*, assim como, realizar a otimização, determinar os parâmetros cinéticos do processo e propriedades dos biopolímeros. Inicialmente, foram realizados alguns testes de produção de PHAs em agitador orbital com diferentes substratos e concentrações das mesmas, diferentes microrganismos, diferentes tempos e temperaturas de fermentação, além de testar métodos para extração do biopolímero nas células do microrganismo. Posteriormente, foi realizado um planejamento experimental DCCR 2² visando determinar a melhor concentração de GBRB e de nitrogênio limitante que produzisse maior quantidade de PHAs. Conhecendo-se as melhores condições para produção de PHAs, realizou-se a mudança no sistema de fermentação, para um biorreator de bancada (4,5L), com o intuito de maximizar a produção de PHAs. Um novo planejamento experimental foi realizado, visando determinar a melhor taxa de aeração e a melhor velocidade de agitação do sistema que proporcionasse a máxima produção de biopolímero. Realizou-se a caracterização dos biopolímeros em termos de FTIR, DSC, TG, DRX, MM e composição monomérica. A Glicerina bruta residual do biodiesel (GBRB) é um substrato rico em nutrientes e pode ser utilizada pelo microrganismo *Cupriavidus necator* em diversas concentrações para a produção de PHAs. O melhor tempo e temperatura para produção de PHAs a partir da fermentação da GBRB por *Cupriavidus necator* IPT 026 foram a 35°C em 72h, respectivamente, na etapa de limitação de nitrogênio. A máxima produção de PHAs e biomassa (2,81 g.L⁻¹ e 4,34 g.L⁻¹, respectivamente) em agitador em agitador orbital (35°C, 72h e 180 rpm), ocorreu com 15 g.L⁻¹ de GBRB e 10 g.L⁻¹ de nitrogênio. Em biorreator, foi possível aumentar a produção de

PHAs em 77%. A máxima produção de PHAs (4,98 g.L⁻¹) ocorreu a 15 g.L⁻¹ de GBRB e 10 g.L⁻¹ de nitrogênio, 1 vvm de taxa de aeração e 500 rpm de velocidade de agitação. A taxa de aeração e a velocidade de agitação foram otimizadas para maximizar a produção de PHAs (1,0373 vvm de taxa de aeração e 502,0396 de velocidade de agitação). O PHA obtido em biorreator por condições otimizadas foi o que apresentou as melhores propriedades. Em relação aos PHAs produzidos em agitador orbital, a T_m elevou em 6%, o grau de cristalinidade reduziu em 10%, a temperatura de degradação aumentou em 8% e a massa molar também se elevou, chegando a 18%. Todos os PHAs apresentaram espectros similares de FTIR de acordo com a literatura. A produção de PHAs a partir da GBRB é uma alternativa de agregação de valor ao resíduo, diminuindo os custos de produção do biopolímero.

Palavras Chaves: Glicerina bruta residual do biodiesel, Polihidroxicanoatos, *Cupriavidus necator*.

ABSTRACT

The diversity of use of polymeric materials involves concern over the use of non-renewable source for its production, as well environmental problems caused by the accumulation volume of solid waste generated. Seeking to minimize this problem were sought alternative of the products similar to plastics petrochemicals, one of them are biodegradable polymers. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polyesters synthesized by microorganisms as natural substances of the carbon reserve and energy, being taken up by the microbial cell in the form of intracellular granules, which may represent up to 80% of the dry cell. The present work aimed to select microorganism and fermentation conditions of glycerin crude residual from biodiesel (GBRB) for the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs), and optimize these conditions in two cropping systems through the influence of these parameters on the production and properties of biopolymers. Initially, some tests were conducted for the production of PHAs on shake flask with different substrates and concentrations of the same, different microorganisms, different fermentation times and temperatures, beyond of the test methods for the extraction of the biopolymer in the cells of the microorganism. Posteriorly, was performed an experimental design DCCR 2² to determine the best concentration GBRB and nitrogen limiting that produced higher amounts of PHAs. Knowing the best conditions for production of PHAs, there was a change in the fermentation system for a bench top bioreactor (4.5 L), in order to maximize the production of PHAs. A new experimental design was conducted to determine the best aeration rate and agitation speed of the system allowing maximum biopolymer production. We carried out the characterization of biopolymers in terms of FTIR, DSC, TG, XRD, MM and monomer composition. The glycerin crude residual from biodiesel (GBRB) is a substrate rich in nutrients and can be used by the microorganism *Cupriavidus necator* at various concentrations to produce PHAs. The best time and temperature for the production of PHAs from the fermentation of GBRB by *Cupriavidus necator* IPT 026 were 35°C for 72 h, respectively, in the stage of nitrogen limitation. The maximum production of PHAs and biomass (2.81 g.L⁻¹ and 4.34 g.L⁻¹, respectively) in shaker flask (35°C, 72 and 180 rpm), occurred with 15 g.L⁻¹ of GBRB and 10 g.L⁻¹ of nitrogen. In the bioreactor, it was possible to increase the production of PHA by 77%. The maximum production of PHAs (4.98 g.L⁻¹) occurred at 15 g.L⁻¹ of GBRB and 10 g.L⁻¹ of nitrogen, 1 vvm

of aeration rate and 500 rpm of agitation speed. The aeration rate and agitation speed were optimized to maximize the production of PHAs (1.0373 vvm of aeration rate and 502.0396 rpm of agitation speed). The PHA obtained in optimized conditions for bioreactor showed the best properties. In relation to PHAs produced in orbital shaker at T_m increased by 6%, the degree of crystallinity reduced by 10%, the degradation temperature increased by 8% and the molar mass is also increased, reaching 18%. All PHAs had similar FTIR spectra according to the literature. The production of PHAs from GBRB is an alternative value added to the residue, reducing the cost of production of the biopolymer.

Keywords: Glycerin crude residual from biodiesel, Polyhydroxyalkanoates, *Cupriavidus necator*.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Mercado mundial de embalagens.....	24
Figura 2: Mercado brasileiro de embalagens.....	24
Figura 3: Produção do setor de produtos plásticos no Brasil (em mil toneladas)	25
Figura 4: Consumo aparente de produtos plásticos no Brasil (em mil toneladas).....	25
Figura 5: Classificação de polímeros biodegradáveis.....	27
Figura 6: Biociclo dos polihidroxialcanoatos.....	30
Figura 7: Formação de grânulo de P(3HB) intracelular na membrana lipídica.....	31
Figura 8: Células bacterianas contendo grânulos de polímero biodegradável, da família dos polihidroxialcanoatos (PHAs) no seu interior (micrografia eletrônica de varredura).....	32
Figura 9: <i>Cupriavidus necator</i> em fase de crescimento e fase de produção	36
Figura 10: Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) de <i>Cupriavidus necator</i> durante produção de P(3HB) 2,5 h (A), 5 h (B), 9 h (C) e 24 h (D), mostrando o "desaparecimento" dos elementos de mediação e dando espaço aos grânulos intracelulares de P(3HB). O tamanho final dos grânulos de P(3HB) após 24 h é de 0,5 μm	38
Figura 11: Produtos do acetil-CoA em condições de crescimento balanceado e de excesso e escassez de carbono.....	40
Figura 12: Síntese de P(3HB) a partir de acetil-CoA por <i>Cupriavidus necator</i>	41
Figura 13: Formação de glicerina bruta durante o processo de transesterificação	45
Figura 14: Comportamento das curvas das concentrações de X, P e S de um processo fermentativo em função do tempo.....	52

CAPÍTULO II

Figura 15: Agitador orbital utilizado para a produção de goma xantana (A) e Plataforma do agitador orbital utilizado para produção de goma xantana (B).....	55
Figura 16: Biorreator Tecnal-TecBio de 4,5 L utilizado para produção de PHAs a partir da fermentação de GBRB.....	60

CAPÍTULO III

Figura 17: Curva de crescimento (620 nm) do inóculo para <i>Cupriavidus necator</i> IPT 026 incubado a 30°C e 150 rpm.....	70
Figura 18: Filme de PHA obtido após evaporação do solvente.....	75
Figura 19: Efeito das concentrações de GBRB de Nitrogênio na produção de PHAs em agitador orbital (35°C/72h/180rpm) por <i>Cupriavidus necator</i> IPT 026	80
Figura 20: Efeito das concentrações de GBRB e de Nitrogênio na produção de biomassa em agitador orbital (35°C/72h/180rpm) por <i>Cupriavidus necator</i> IPT 026	82
Figura 21: Espectro de FTIR obtido para PHAs produzidos a partir de GBRB.....	83
Figura 22: Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) para PHAs obtidos a partir de GBRB.....	84
Figura 23: Análise termogravimétrica de PHAs obtidos a partir de GBRB.....	86
Figura 24: Análise de DRX para PHAs obtidos a partir da GBRB.....	87
Figura 25: Cromatograma CLAE-IR para os PHAs obtidos a partir da GBRB.....	88
Figura 26: Cromatogramas GC/MS: (A) PHA Padrão (Sigma-Aldrich); (B) PHA produzido no experimento 1 e (C) PHA produzido no experimento 7.....	90
Figura 27: Representação esquemática de uma possível composição química dos PHAs produzidos por <i>Cupriavidus necator</i> IPT 026 a partir da fermentação de GBRB em agitador orbital (35°C, 72 h, 180 rpm)	91
Figura 28: Produção de biomassa (■) e produção de PHAs (○) a partir de um experimento em biorreator 4,5L (35°C, 72 h, pH 7.0, taxa de aeração de L min ⁻¹ , 500 rpm)	94
Figura 29: Espectros de FTIR: (....) PHA biorreator, (—) PHA agitador orbital.....	95
Figura 30: Análise de DSC: (—) PHA biorreator e (....) PHA agitador orbital.....	96
Figura 31: Análises termogravimétricas: (....) PHA agitador orbital e (—) PHA biorreator	96
Figura 32: Análise de DRX: (....) PHA agitador orbital e (—) PHA biorreator.....	97
Figura 33: Cromatogramas por CLAE-IR: (....) PHA agitador orbital e (—) PHA biorreator. .	98
Figura 34: Cromatogramas GC/MS: (A) PHA agitador orbital e (B) PHA biorreator.....	99
Figura 35: Representação esquemática de uma possível composição química dos PHAs produzidos por <i>Cupriavidus necator</i> IPT 026 a partir da fermentação de GBRB em diferentes sistemas de cultivo: agitador orbital (15 g.L ⁻¹ de GBRB, 10 g.L ⁻¹ de nitrogênio, 35°C, 72h e	

180 rpm) e biorreator (15 g.L ⁻¹ de GBRB, 10 g.L ⁻¹ de nitrogênio, 35°C, 96h, 500 rpm e 1vvm)	100
.....	
Figura 36: Efeito da taxa de aeração/velocidade de agitação na produção de PHAs em biorreator (35°C/72h)	107
Figura 37: Efeito da taxa de aeração/velocidade de agitação na produção de biomassa em biorreator (35°C/72h)	108
Figura 38: Acompanhamento do consumo de substrato e formação de biomassa e produto ao longo de 96 horas de fermentação de GBRB em biorreator de 4,5L (35°C, 72 horas, pH 7,0, 1 vvm, 500 rpm) por <i>Cupriavidus necator</i> IPT 026	110
Figura 39: Espectros de FTIR obtido para PHAs produzidos a partir de GBRB	112
Figura 40: Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) para PHAs obtidos a partir de GBRB por biorreator	113
Figura 41: Análise termogravimétrica de PHAs obtidos a partir de GBRB	115
Figura 42: Análise de DRX para os PHAs obtidos a partir da GBRB	116
Figura 43: Cromatogramas CLAE-IR para os PHAs obtidos a partir da GBRB	117
Figura 44: Cromatogramas GC/MS: (A) PHA experimento 3; (B) PHA experimento 5 e (C) PHA experimento 9	118
Figura 45. Representação esquemática de uma possível composição química dos PHAs produzidos por <i>Cupriavidus necator</i> IPT 026 a partir da fermentação de GBRB em biorreator, nas condições dos Experimentos 1 (0,5 vvm e 250 rpm), 5 (0,3 vvm e 500 rpm), e 9 (1 vvm e 500 rpm)	120

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Consumo per capita brasileiro de plástico (kg/hab)	26
Tabela 2: Estrutura geral dos PHAs e diferentes radicais que podem compor os monômeros dos polímeros.....	32
Tabela 3: Comparação entre as propriedades físicas e térmicas dos vários PHAs e do polipropileno.....	34
Tabela 4: Bactérias e nutrientes cuja escassez pode conduzir à produção de PHAs.....	35
Tabela 5: Diferentes substratos alternativos, microrganismos e condições de fermentação para produção de PHAs.....	43
Tabela 6: Microrganismos, condições de produção, valores de biomassa e de PHAs, propriedades e dados cinéticos da produção de PHAs a partir da glicerina bruta do biodiesel.....	47

CAPÍTULO II

Tabela 7: Composição do Meio Mineral sem limitação em nutrientes.....	55
Tabela 8: Composição da solução concentrada de oligoelementos.....	55
Tabela 9: Matriz do planejamento experimental composta com a variável concentração do substrato alternativo selecionado (X_1) e concentração de nitrogênio limitante (X_2) e seus respectivos níveis em valores reais e codificados.....	59
Tabela 10: Matriz do planejamento experimental composta com a variável taxa de aeração (X_1) e velocidade de agitação (X_2) e seus respectivos níveis em valores reais e codificados.....	61

CAPÍTULO III

Tabela 11: Composição química da glicerina bruta residual do biodiesel utilizada na etapa de fermentação para obtenção de PHA.....	65
--	----

Tabela 12: Produções de biomassa e de PHAs a partir de diferentes concentrações e diferentes substratos em agitador orbital (180 rpm, 30°C, 48h) por <i>Cupriavidus necator</i> IPT 026	67
Tabela 13: Produções de biomassa e de PHAs a partir de glicose e GBRB por diferentes microrganismos em agitador orbital (180 rpm, 30° C, 48h).....	68
Tabela 14: Produções de PHAs e alginato, e rendimento de extração de PHAs a partir da fermentação de diferentes concentrações e glicose e GBRB em agitador orbital em agitador orbital (180 rpm, 30° C, 48h).....	71
Tabela 15: Produções de biomassa e de PHAs em função do tempo de fermentação e da temperatura em agitador orbital (180 rpm, 30° C, 48h) por <i>Cupriavidus necator</i> IPT 026.	73
Tabela 16: Rendimentos de extrações de PHA a partir de diferentes métodos.....	74
Tabela 17: Planejamento experimental (condições e respostas) para as produções de PHAs e biomassa em agitador orbital (35° C, 72 h, 180 rpm) por <i>Cupriavidus necator</i> IPT 026.....	76
Tabela 18: Coeficientes estimados de determinação múltipla para produção de PHAs (A) e de biomassa (B) utilizando valores codificados.....	77
Tabela 19: Análise de variância (ANOVA) para a produção de PHAs (A) e biomassa (B) usando valores codificados.....	78
Tabela 20: Valores de T_m , $T_{on\ set}$, T_{decomp} e grau de cristalinidade para PHAs obtidos nos experimentos do planejamento experimental por <i>Cupriavidus necator</i> IPT 026 com GBRB em agitador orbital (35° C, 72 h, 180 rpm).....	85
Tabela 21: Tempo de retenção (T_r) e massa molar (MM) de PHAs obtidos a partir de GBRB em agitador orbital.....	89
Tabela 22: Perfil monomérico de PHAs (padrão e produzidos em agitador orbital).....	91
Tabela 23: Tempo de retenção (T_r) e massa molar de PHAs produzidos em agitador orbital e biorreator.....	98
Tabela 24: Composição monômerica dos PHAs produzidos em agitador orbital e biorreator por <i>Cupriavidus necator</i> IPT 026 por fermentação da GBRB.....	99
Tabela 25: Planejamento experimental (condições e respostas) para produção de PHAs e biomassa em biorreator (35°C, 72 h) por <i>Cupriavidus necator</i> IPT 026 com GBRB.....	103
Tabela 26: Coeficientes estimados de determinação múltipla para produção de PHAs (A) e de biomassa (B) utilizando valores codificados.....	104

Tabela 27: Análise de variância (ANOVA) para a produção de PHAs (A) e biomassa (B) usando valores codificados.....	105
Tabela 28: Produção de PHAs antes e após a otimização.....	109
Tabela 29: Parâmetros cinéticos obtidos ao longo de 96h de fermentação de GBRB por <i>Cupriavidus necator</i> nas condições otimizadas de taxa de aeração e velocidade de agitação em biorreator (1,0 vvm, 500 rpm, 3,0 L de volume útil).....	111
Tabela 30: Valores de T_m , $T_{on\ set}$, T_{decomp} , grau de cristalinidade e MM para PHAs obtidos nos experimentos do planejamento experimental.....	114
Tabela 31: Perfil monomérico de PHAs produzidos em biorreator por <i>Cupriavidus necator</i> IPT 026 e GBRB.....	119

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
OBJETIVOS	23
OBJETIVO GERAL.....	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
1 Os plásticos e os impactos ambientais.....	24
2 Polímeros biodegradáveis.....	26
3 Biodegradação.....	29
4 Polihidroxialcanoatos – PHAs.....	30
4.1 Propriedades dos PHAs.....	33
4.2 Aplicações.....	34
4.3 Microrganismos produtores de PHAs.....	35
4.3.1 <i>Cupriavidus necator</i>	36
4.3.2 Metabolismo do <i>Cupriavidus necator</i> – Síntese do P(3HB)	38
4.4 Resíduos agroindustriais para produção de PHAs.....	41
4.4.1 Glicerina bruta residual do biodiesel.....	44
4.5 Processos fermentativos.....	49
4.5.1 Processo para produção de PHAs.....	50
4.5.2 Cinética de processos fermentativos.....	51
CAPÍTULO II - MATERIAL E MÉTODOS	53
5 Caracterização físico-química da glicerina bruta residual do biodiesel.....	53
6 Microrganismos.....	53
7 Produção de polihidroxialcanoatos (PHAs).....	54

7.1 Seleção de substratos, microrganismo, condições de fermentação e método de extração de PHAs obtidos em agitador orbital	54
7.1.1 Utilização de diferentes substratos para a produção de PHAs	54
7.1.2 Seleção de cepas de <i>Cupriavidus necator</i> quanto à capacidade de produzir PHAs	56
7.1.3 Efeito das concentrações dos substratos na produção de PHAs e Alginato	57
7.1.4 Efeito do tempo e da temperatura na produção de PHAs	57
7.1.5 Influência de diferentes métodos na extração de PHAs	57
7.2 Avaliação das concentrações do substrato alternativo selecionado e de nitrogênio limitante na produção de PHAs em agitador orbital.....	57
7.3 Avaliação da taxa de aeração e da velocidade de agitação na produção de PHAs em biorreator	60
7.4 Cinética do processo fermentativo	61
8 Propriedades dos PHAs obtidos nos diferentes experimentos.....	62
8.1 Infra-Vermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	63
8.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	63
8.3 Análise termogravimétrica (TG).....	63
8.4 Difração de raio-x (DRX).....	63
8.5 Massa molecular.....	64
8.6 Composição química dos PHAs.....	64

CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

9 Caracterização físico-química da Glicerina Bruta Residual do Biodiesel (GBRB)	65
10 Produção de polihidroxialcanoatos.....	66
10.1 Seleção de substratos, microrganismo, condições de fermentação e método de extração de PHAs obtidos em agitador orbital.....	66
10.1.1 Utilização de diferentes substratos (Glicose, Sacarose, Glicerol PA, Resíduo líquido de sisal - RLS e Glicerina bruta residual do biodiesel – GBRB) para a produção de PHAs	66
10.1.2 Seleção de cepa de <i>Cupriavidus necator</i> quanto à capacidade de produzir PHAs (screening)	68
10.1.3 Efeito das concentrações de GBRB e glicose na produção de PHAs e Alginato em agitador orbital.....	70

10.1.4 Efeito do tempo e da temperatura na produção de PHAs a partir da fermentação de GBRB e Glicose em agitador orbital.....	71
10.1.5 Influência de diferentes métodos na extração de PHAs produzidos a partir de GBRB em agitador orbital (180 rpm, 30° C, 48h) por <i>Cupriavidus necator</i> IPT 026	74
10.1.6 Conclusões parciais	75
11 Influência das concentrações de GBRB e de nitrogênio na produção de PHAs por <i>Cupriavidus necator</i> IPT 026 em agitador orbital usando metodologia de superfície de resposta e suas propriedades.....	75
11.1 Tratamento das respostas dos experimentos.....	76
11.2 Influência da concentração de GBRB e de nitrogênio na produção de PHAs (Resposta Y ₁)	79
11.3 Influência das concentrações de GBRB e de nitrogênio na produção de Biomassa (Resposta Y ₂)	81
11.4 Influência da variação das concentrações de GBRB e de nitrogênio nas propriedades dos PHAs.....	83
11.4.1 Infra-Vermelho com Transformada de Faurier (FTIR)	83
11.4.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e Análise termogravimétrica (TG)	84
11.4.3 Difração de raio-X (DRX)	86
11.4.4 Massa molar (MM)	87
11.4.5 Composição monomérica	90
11.5 Conclusões parciais	92
12 Influência de diferentes sistemas de fermentação na produção e nas propriedades de PHAs obtidos a partir de GBRB	93
12.1 Produção de PHAs em agitador orbital e biorreator.....	93
12.2 Influência de diferentes sistemas de fermentação de GBRB nas propriedades de PHAs	94
12.2.1 Infra-Vermelho com Transformada de Faurier (FTIR)	95
12.2.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e Análise termogravimétrica (TG)	95
12.2.3 Difração de raio-X (DRX)	97
12.2.4 Massa molar (MM)	98
12.2.5 Composição monomérica	99
12.3 Conclusões parciais	101

13 Influência da taxa de aeração e da velocidade de agitação na produção de PHAs em biorreator a partir de GBRB por <i>Cupriavidus necator</i> IPT 026: otimização, cinética e propriedades.....	102
13.1 Análise dos dados experimentais.....	103
13.2 Influência da taxa de aeração e da velocidade de agitação na produção de PHAs (Resposta Y_1)	106
13.3 Influência da taxa de aeração e da velocidade de agitação na produção de biomassa (Resposta Y_2)	108
13.4 Verificação do modelo.....	109
13.5 Parâmetros cinéticos nas condições otimizadas em biorreator.....	110
13.6 Propriedades dos PHAs obtidos nos experimentos em biorreator.....	112
13.6.1 Infra-Vermelho com Transformada de Faurier (FTIR)	112
13.6.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TG)	113
13.6.3 Difração de raio-X (DRX)	115
13.6.4 Massa molar (MM)	116
13.6.5 Composição monomérica	118
13.7 Conclusões parciais	120
CONSIDERAÇÕES FINAIS	122
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123

INTRODUÇÃO

Os materiais poliméricos estão inseridos na vida cotidiana sob variadas formas, incluindo embalagens, filmes, lubrificantes e agentes de revestimento. A razão para esta diversidade é o fato de possuírem excelentes propriedades como, durabilidade, resistência à degradação e à corrosão por ácidos e bases, e ainda pelo fato de serem de baixo custo. Por outro lado, o descarte indiscriminado desses materiais em aterros e lixões, torna-se um sério problema ambiental, por apresentarem baixas velocidades de degradação permanecem no ambiente por até 400 anos devido a alta massa molar e à conformação da cadeia carbônica, que dificulta a ação dos microrganismos no processo degradativo, acarretando sérios problemas de desequilíbrio ambiental e grande acúmulo de materiais em lixões e aterros (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997; RODRIGUES, 2005; GARCIA, 2006; QUINES, 2010). Estes problemas, aliados à emissão de compostos tóxicos quando da incineração destes materiais, fazem com que surja a necessidade de substituí-los por alternativas viáveis do ponto de vista ambiental e econômico (PANDEY, 2004; FRANCHETTI e MARCONATTO, 2006; FARIA e RANCHETTI, 2010).

Em resposta à crescente preocupação com os problemas ambientais causados pela produção e acúmulo de materiais poliméricos de origem petroquímica, muitos países estão realizando estudos de gerenciamento e diminuição do volume de lixo sólido, buscando ainda a produção de polímeros biodegradáveis, a partir de fontes renováveis de carbono (KOLLER et al., 2007). Portanto, estes novos materiais devem possuir as propriedades desejáveis dos polímeros convencionais, serem produzidos a partir de substratos renováveis e ainda apresentarem completa e rápida biodegradabilidade, quando descartados no meio ambiente (PIEMOLINI, 2004).

Dentre os polímeros biodegradáveis em desenvolvimento, destacam-se os polihidroxicanoatos (PHAs), os quais são acumulados intracelularmente por microrganismos de diversos gêneros, como reserva de energia, sob limitação de um nutriente essencial ao seu crescimento, como nitrogênio, fósforo, enxofre ou oxigênio, paralelamente ao excesso da fonte de carbono (KHARDENAVIS et al., 2007).

Quimicamente, os PHAs são ésteres. A composição dos monômeros dos PHAs depende da capacidade metabólica do microrganismo utilizado e da especificidade pelo substrato com a enzima PHA sintase que, conseqüentemente determina as propriedades físico-

químicas dos PHAs formados (LEE, 1996; REHM, 2003). Os PHAs podem ser classificados em dois grupos: os polímeros constituídos de unidades monoméricas de 5 carbonos ou menos, são denominados de cadeia lateral curta (*short-side-chain*) (PHA_{SSC}). Os polímeros com unidades monoméricas com mais de 6 carbonos são os de cadeia lateral média (PHA_{MSC}) ou cadeia lateral longa (PHA_{LSC}) (RAMSAY, 1994). Os PHA_{SSC} possuem características próximas às dos termoplásticos, enquanto que os PHA_{MSC} aproximam-se às de termofixos (TIM e STEINBÜCHEL, 1990).

Os PHAs são considerados uma importante alternativa aos materiais poliméricos convencionais como, polipropileno e polietileno (SHEU et al., 2009; MIZUNO et al., 2010; TAY et al., 2010). Devido às suas características físicas e químicas, apresentam aplicações amplas tanto como matéria plástica convencional, como na medicina, para fabricação de materiais de sutura e prótese óssea, na indústria farmacêutica, para a produção de cápsulas para a liberação controlada de fármacos, e, na indústria de alimentos, como embalagens (LEE e CHOI, 1997; STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998; NASCIMENTO, 2001).

Apesar das diversas possibilidades de aplicações na indústria, os PHAs apresentam alto custo de produção, comparativamente aos polímeros petroquímicos (VALENTIN et al., 2000; KHANNA e SRIVASTAVA, 2006; PRADELLA, 2006), em geral, este custo chega a ser quatro vezes superior (FALCONE e AGNELLI, 2007). Diante disto, diferentes estratégias de viabilização econômica da produção dos PHAs têm sido investigadas, tais como a obtenção de linhagens de microrganismos altamente eficientes na conversão dos substratos no produto desejado, uso de fontes de carbono e nutrientes de baixo valor econômico, técnicas mais eficientes para extração e recuperação do polímero e o desenvolvimento de processos fermentativos (temperatura utilizada, taxa de aeração, velocidade de agitação e pH do meio) (LEE e CHOI, 1997; ALMEIDA et al., 2004, KHANNA e SRIVASTAVA, 2005; KHARDENAVIS et al., 2007).

De fato, os custos no processo com a fonte de carbono e a recuperação do polímero são os dois maiores fatores responsáveis pelo elevado preço dos PHAs. Estima-se que 40 % do custo seja referente a fonte de carbono (etapa de produção), sendo o impacto do custo de recuperação de PHAs no custo total do processo de produção equivalente a até 50 % do valor do produto, dependendo de variáveis como o processo de separação empregado e o teor de PHAs acumulados na biomassa, uma vez que o biopolímero é um produto intracelular, e os

métodos adotados para recuperação e purificação dos PHAs são complexos (NONATO et al., 2001).

Segundo levantamento realizado pelo CGEE – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (2013), a capacidade total instalada de produção de PHAs no mundo é da ordem de 2.250 t/ano. Embora, com pequena escala de produção, apresenta enorme potencial de substituição dos polímeros convencionais e tendência à expansão de produção a curto/médio prazo, previsão da taxa de crescimento do consumo para os próximos anos é de 42% até 2020. Existem perspectivas para os próximos anos da Metabolix com a ADM dos EUA de construção e operação comercial de planta de 50.000 t/ano e da P&G com a Kaneka Corp. do Japão para implantação de operação comercial de 30.000 t/ano.

A utilização de substratos alternativos de baixo custo em processos fermentativos, tais como resíduos agroindustriais, permite a redução dos custos de produção minimizando problemas ambientais, pois auxilia na destinação desses resíduos (WOICIECHOWSKI, 2001). A literatura cita o uso de glicose e frutose como fontes de carbono convencionais para a produção de biopolímeros (SUTHERLAND, 2002), porém, algumas fontes alternativas têm sido sugeridas, tais como cana-de-açúcar, beterraba e melão cítrico (FIORESE, 2004; IENCZAK, 2006), além dos resíduos industriais de soja, batata, mandioca, arroz, maçã, soro de leite, casca de café, glicerina do biodiesel, entre outros (KOLLER et al., 2008; NATH et al., 2008; NIKEL et al., 2008; YU e STAHL, 2008; CAVALHEIRO et al., 2009; CAVALHEIRO et al., 2012; PANTAZAKI et al., 2009).

A glicerina bruta residual do biodiesel (GBRB) é um importante subproduto do processo de produção de biodiesel. De acordo com Cardona, Posada e Montoya (2007) a cada 45,3 Kg de biodiesel produzido são gerados 4,53 Kg de glicerina residual. Assim, Da Silva et al. (2009) e Albarelli et al. (2011), estimam que entre 2008 e 2013, a indústria de biodiesel brasileiro terá um excedente de 70.000 toneladas de glicerina por ano, aumentando assim as possibilidades de impactos ambientais. Considerando que a GBRB é composta principalmente de resíduos de etanol ou metanol, glicerol, ácidos graxos residuais, esta fonte de carbono tem precursores diretos para síntese bacteriana de biopolímeros, como PHAs ou outros bioprodutos (ASHBY et al., 2004; JOHNSON e TACONI, 2007; ANDRE et al., 2010). Nesse contexto, a utilização desse resíduo como fonte de carbono torna-se uma alternativa promissora para a síntese de PHAs com redução nos custos de processo.

A relevância desta pesquisa pela obtenção de PHAs reside, no fato da mesma, contribuir para a redução dos custos de produção deste polímero, contribuir na redução considerável do volume de resíduos sólidos que permanecem acumulados durante muitos anos até sua total decomposição quando usados polímeros de origem petroquímica, além de fornecer uma opção interessante de aumento do valor agregado para a GBRB, às indústrias produtoras de biodiesel.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Selecionar microrganismo e condições de fermentação da glicerina bruta residual do biodiesel (GBRB) para a produção de polihidroxialcanoatos (PHAs), e otimizar estas condições em dois sistemas de cultivo através da influência destes parâmetros na produção e nas propriedades dos biopolímeros.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o potencial da GBRB como substrato fermentecível para a obtenção de PHAs;

Selecionar microrganismo e condições de fermentação de GBRB para a obtenção de PHAs;

Selecionar método de extração de PHAs da célula do microrganismo selecionado;

Avaliar a influência das concentrações de GBRB e de nitrogênio na produção de PHAs pelo microrganismo selecionado em agitador orbital utilizando metodologia de superfície de resposta;

Determinar a influência das concentrações de GBRB e de nitrogênio nas propriedades dos PHAs produzido pelo microrganismo selecionado;

Verificar a influência de diferentes sistemas de fermentação na produção e nas propriedades de PHAs obtidos a partir de GBRB pelo microrganismo selecionado;

Avaliar a influência da taxa de aeração e da velocidade de agitação do biorreator na produção de PHAs a partir da GBRB pelo microrganismo selecionado utilizando metodologia de superfície de resposta;

Otimizar as variáveis do processo que maximizam a produção de PHAs em agitador orbital e em biorreator de bancada (4,5L);

Determinar os parâmetros cinéticos que maximizam a produção de PHAs a partir do ponto otimizado em biorreator de bancada (4,5L);

Determinar a influência da taxa de aeração e da velocidade de agitação do biorreator nas propriedades dos PHAs.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 Os plásticos e os impactos ambientais

O desenvolvimento socioeconômico, a crescente urbanização e a evolução dos hábitos e modos de vida geram consumo excessivo, conduzindo a um uso indiscriminado dos recursos naturais e à geração de grandes volumes de resíduos (ZENI e PENDRAK, 2006; GARBOSA e TRINDADE, 2008).

Segundo Sarantopoulos e Rego (2012), o mercado mundial e o brasileiro de embalagens no ano de 2010 eram liderados pelo plástico, seguido pelo papel e o metal, com fatias próximas de mercado e bem menos representativas, o vidro e a madeira, conforme ilustram as Figuras 1 e 2. Para 2015 é esperado um crescimento mundial de 5% na produção de plásticos.

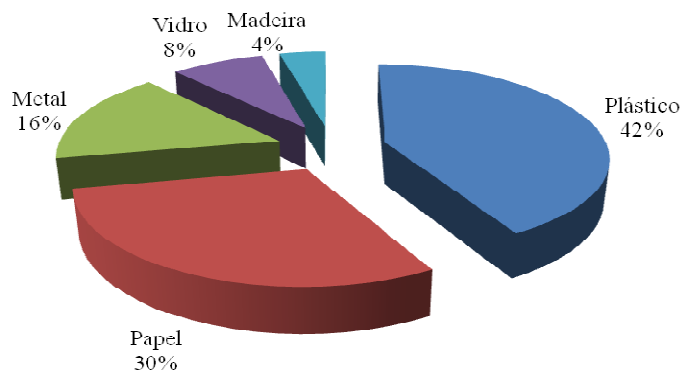


Figura 1: Mercado mundial de embalagens (SARANTOPOULOS e REGO, 2012).

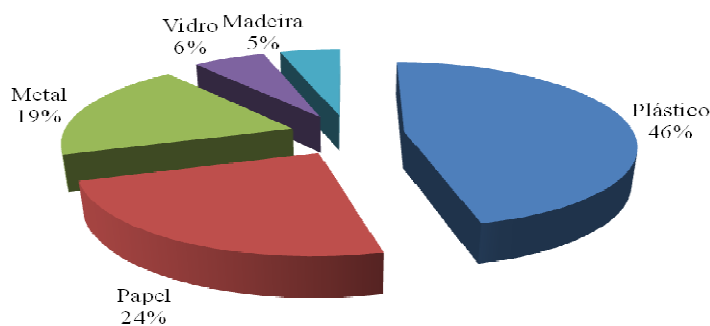


Figura 2: Mercado brasileiro de embalagens (SARANTOPOULOS e REGO, 2012).

No decorrer do século, o uso de plásticos tem se tornado cada vez mais frequente na sociedade, sendo a sua produção mundial da ordem de 150 milhões de toneladas ano, e o consumo per capita brasileiro correspondente a 28 kg por pessoa, por ano em média, o que significa um crescimento de cerca de 20 % em apenas 10 anos. Dados estatísticos da ABIPLAST (2010) mostram que, no Brasil, a produção total anual de transformados de plástico de origem petroquímica em 2009 foi de 5,2 milhões de toneladas. As Figuras 3 e 4, ilustram a evolução da produção de transformados plásticos e do consumo aparente dos mesmos, enquanto que a Tabela 1, mostra o consumo per capita brasileiro destes produtos.

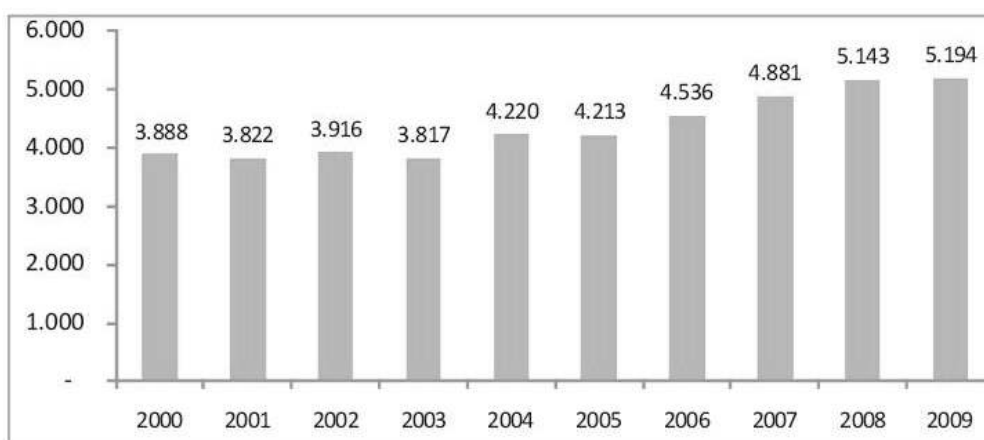


Figura 3: Produção do setor de produtos plásticos no Brasil (em mil toneladas) (ABIPLAST, 2010).

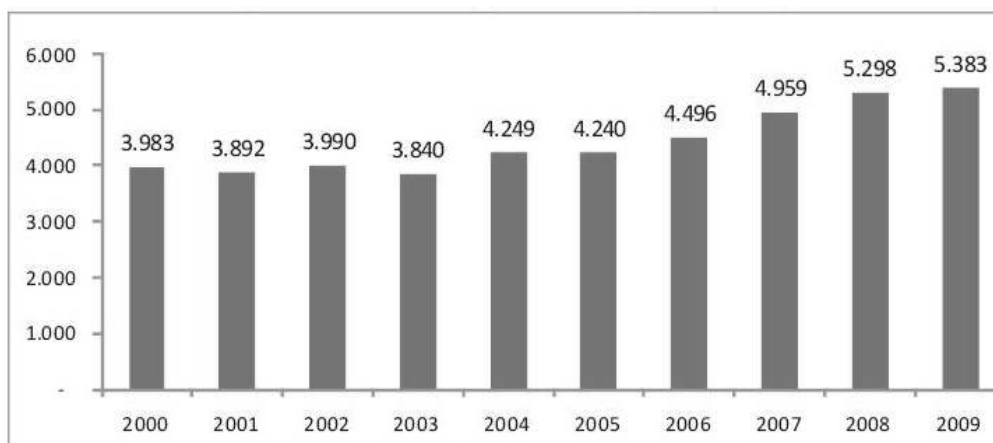


Figura 4: Consumo aparente de produtos plásticos no Brasil (em mil toneladas) (ABIPLAST, 2010).

Tabela 1: Consumo per capita brasileiro de plástico (kg/hab).

2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
23,41	22,57	22,85	21,71	23,72	23,38	24,49	26,7	27,74	27,94

Variadas aplicações acarretaram uma grande produtividade deste insumo, conduzindo a uma enorme geração de resíduos sólidos. Uma das grandes virtudes dos plásticos está na sua durabilidade, entretanto, esta se tornou também seu maior problema, em se tratando do descarte (RODRIGUES, 2005), uma vez que a taxa de geração é muito maior que a taxa de degradação.

Segundo MIRALLES (1999), mais de 30 % dos plásticos que são utilizados diariamente duram apenas os segundos que leva-se para desembulhar um produto e rapidamente serão descartados nos aterros sanitários, que já estão saturados de resíduos plásticos. Tal acúmulo de lixo dificulta a circulação de líquidos e gases e retarda a estabilização de matéria orgânica, causando danos à natureza (SANTOS et al., 2001; FRANCHETTI e MARCONATO, 2006).

Dentre os maiores problemas ambientais relacionados à utilização de materiais poliméricos, tais como o polipropileno (PP), poliestireno (PS), polietileno (PE), poli (cloreto de vinila) (PVC), entre outros, podem ser destacados o elevado tempo de degradação e a utilização de recursos não renováveis a curto prazo derivados do petróleo (OTAKE et al., 1995).

Recentemente, esforços visando preservar o ecossistema têm levado à busca de novos materiais poliméricos que possam substituir parcialmente os materiais sintéticos (CARASCHI et al., 2002; ROSA et al., 2002; QUINES, 2010). Como alternativas para a minimização dos impactos causados pelos plásticos ao meio ambiente, vários estudos têm se voltado ao desenvolvimento e ao processamento dos polímeros biodegradáveis, que vêm despertando um crescente interesse devido à amplitude de suas aplicações, que não ficam restritas somente à área ambiental, mas também à área biomédica (DUARTE et al., 2004).

2 Polímeros biodegradáveis

Uma vasta gama de alternativas biodegradáveis tem sido proposta para mitigar o problema dos plásticos convencionais. A indústria mundial do plástico investiu na onda verde e trouxe à tona uma diversidade de polímeros sob o prefixo “bio”. O apelo embutido nessas três letras tem sido forte o suficiente para sensibilizar a sociedade em todo o mundo.

De acordo com FRANCHETTI e MARCONATO (2006), os chamados biopolímeros são principalmente polímeros formados durante o ciclo de crescimento de organismos vivos, denominados então, de polímeros naturais. Sua síntese envolve, geralmente, reações catalisadas por enzimas e reações de crescimento de cadeia a partir de monômeros ativados, que são formados dentro das células por processos metabólicos complexos.

Os polímeros considerados biodegradáveis, devem ter a capacidade de se degradar de modo seguro por ação biológica, ou seja, a biodegradação de um determinado material ocorre quando ele é usado como nutriente por um determinado conjunto de microrganismos (bactérias, fungos ou algas) que existe no meio ambiente onde o material vai ser degradado, gerando CO₂, CH₄, componentes celulares e outros produtos, segundo estabelecido pela “*American Standard for Testing and Methods*” (ASTM-D-833) (LEE e CHOI, 1998; RAGHVAN, 1995, FRANCHETTI e MARCONATO, 2006). Ou de outro modo, são materiais que se degradam em dióxido de carbono, água e biomassa, como resultado da ação de organismos vivos ou enzimas (ROSA et al., 2004).

Os polímeros biodegradáveis podem ser classificados de acordo com a composição química, com o seu método de síntese, com o método de processamento, com a importância econômica, com a aplicação, entre outras formas. Contudo, segundo VERHOOGT et al. (1994), eles podem ser classificados em duas categorias de acordo com a sua fonte de obtenção: rotas sintéticas ou naturais, incluindo plantas e microrganismos, conforme esquema apresentado na Figura 5.

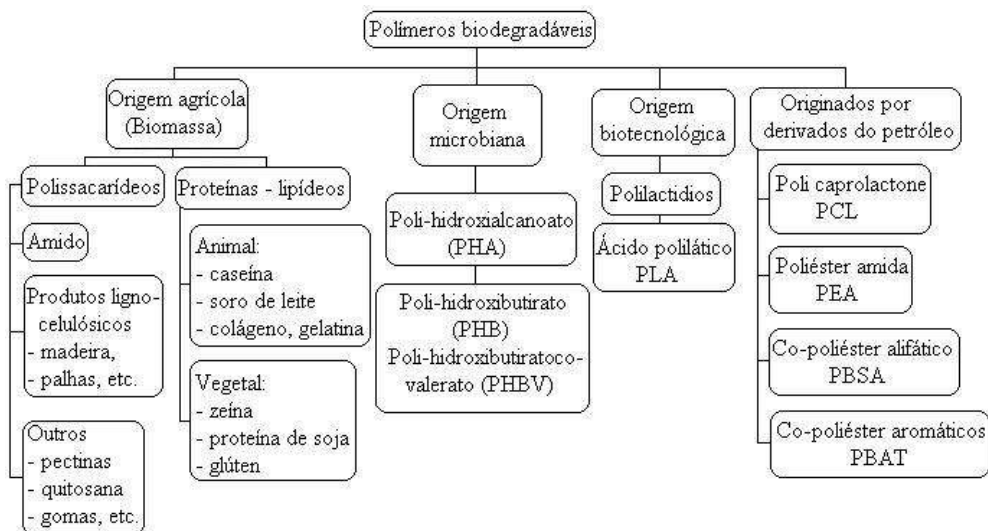


Figura 5: Classificação de polímeros biodegradáveis (VERHOOGT et al., 1994).

Os polímeros biodegradáveis ou polímeros naturais encontram-se divididos em 4 categorias:

a) Polissacarídeos: são formados basicamente por unidades de glicose, ligadas como anéis de grupos acetais (aldeído e álcool) e, portanto, com grande quantidade de grupos hidroxilas (alta hidrofiliabilidade). Os principais polissacarídeos de interesse industrial são celulose e amido, havendo uma atenção especial aos carboidratos mais complexos como quitosana, quitinas e xantanas (CHANDRA e RUSTIGI, 1998).

b) Ácidos algínicos: são formados de monômeros de ácido manurônico e gulurônico, são solúveis em água e tornam-se insolúveis na presença de cátions, como cálcio, alumínio e ferro, formando géis, que podem servir para liberação controlada de drogas em sistemas vivos, para encapsulamento de herbicidas, microrganismos e células (CHANDRA e RUSTIGI, 1998).

c) Polipeptídeos naturais: gelatinas são polímeros biodegradáveis, consistindo de proteínas do tipo animal, com grande aplicação industrial, farmacêutica e biomédica, empregados como coberturas e microencapsulação de drogas e no preparo de hidrogéis (FRANCHETTI e MARCONATO, 2006).

d) Poliésteres bacterianos: são poliésteres naturais, produzidos por uma grande variedade de bactérias, como materiais de reserva intracelular, e têm sido alvo de muita atenção para aplicações comerciais, como polímeros biodegradáveis, vantajosamente produzidos por fontes renováveis. Os mais conhecidos são os polihidroxialcanoatos, principalmente o poli (3-hidroxi-butirato) P(3HB) e poli (3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) P(3HB-co-3HV) (CHANDRA e RUSTIGI, 1998; REDDY et al., 2003).

Segundo relato de RETO (2010), estudos brasileiros envolvendo a produção de resinas biodegradáveis derivadas de fontes renováveis existem há algum tempo. Envolvida com o tema desde 1992, a Usina da Pedra implantou três anos depois, em Serrana-SP, uma unidade em escala piloto, onde foi testada a síntese de um poliéster derivado da cana-de-açúcar, biodegradável e compostável, o poli (3-hidroxi-butirato) P(3HB) e do seu copolímero, o polihidroxi-butirato/valerato (PHB-HV). Cinco anos mais tarde, o grupo Balbo entrou na sociedade e constituiu a PHB Industrial, atualmente detentora do nome comercial Biocycle em seus produtos. A Copersucar (antiga Cooperativa dos Produtores de Cana, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo, hoje Copersucar S.A.) e o Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) participaram do projeto até a instalação da unidade piloto, quando se desligaram do

empreendimento. Hoje a PHB Industrial responde pelo desenvolvimento e propriedade da tecnologia.

De acordo com o mesmo autor, o impacto ambiental seria minimizado graças à biocompatibilidade do P(3HB). Em contato com o meio ambiente e sob determinadas condições, o polímero sofre degradação e se transforma nos elementos naturais que o compõe, fechando assim o ciclo de vida natural, sem impacto negativo à natureza, independente de estar em um ambiente ideal para a degradação como nas estações de compostagem, ou em aterros ou lixão.

3 Biodegradação

Juntamente com a fotólise, a biodegradação é uma das principais formas através das quais os polímeros podem se decompor. A biodegradabilidade é definida como a capacidade que um composto tem em se decompor, principalmente em produtos inócuos, pela ação de organismos vivos, tais como microrganismos. Neste campo, as bactérias e os fungos são os principais intervenientes nos processos de biodegradação existentes no mundo natural. A decomposição desses materiais permite-lhes obter precursores para componentes celulares e a energia para os processos internos que exigem. Alguns polímeros sintéticos podem ser microbiologicamente degradados, no entanto esse processo é normalmente muito lento, e a maioria possui composições químicas resistentes a ataques enzimáticos. Isto não acontece com os polímeros de origem biológica, muitos dos quais têm propriedades similares às dos polímeros sintéticos (BRAUNEGG et al., 1998).

A velocidade de biodegradação dos polímeros biodegradáveis é função de vários fatores, como população microbiana presente no ambiente, temperatura, umidade, pH, nutrientes presentes no meio, cristalinidade, aditivos e área superficial dos polímeros. Estes polímeros são sólidos insolúveis em água, enquanto as depolimerases são enzimas solúveis. Por isso, a degradação acontece através de uma reação heterogênea em duas etapas. A primeira é a de adsorção da enzima na superfície do polímero e a segunda, a de hidrólise das cadeias poliméricas, pelo sítio ativo da enzima. A hidrólise sempre ocorre em uma superfície reacional, entre as enzimas adsorvidas e sítios de adsorção livres (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005).

A Figura 6 representa o biociclo completo de produção e degradação de polihidroxicanoatos (PHAs). Neste ciclo através da fotossíntese, as plantas utilizam a luz solar, CO₂ e água para produzir carboidratos. Estes na forma de açúcares simples podem ser utilizados como substrato em um processo fermentativo com microrganismos específicos produzindo PHAs, podendo ser 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 formar CO₂ e água.

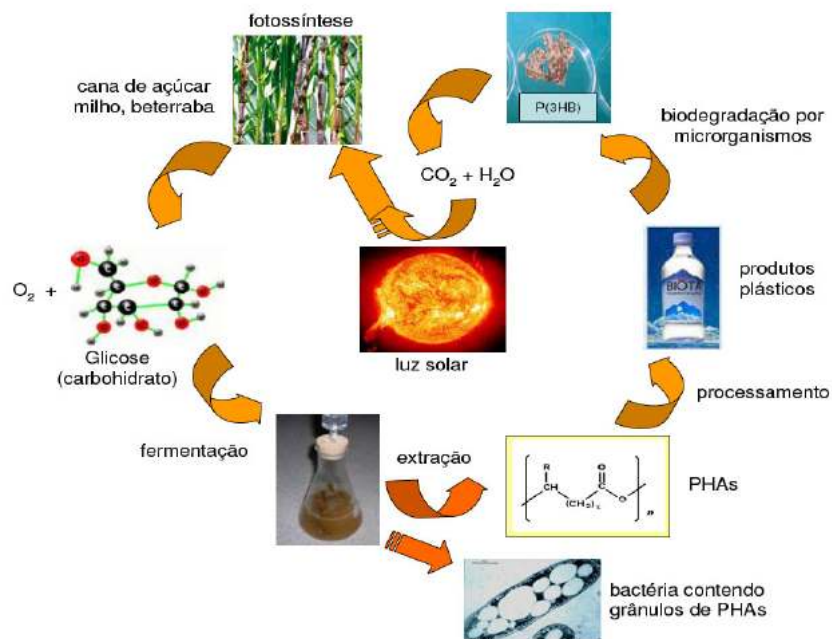


Figura 6: Biociclo dos polihidroxicanoatos (GARCIA, 2006).

4 Polihidroxicanoatos – PHAs

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres biodegradáveis produzidos por diversas bactérias como materiais de reserva. A observação desta inclusão nas células bacterianas remonta ao pesquisador Beijerinck em 1888, mas o reconhecimento e a primeira determinação da composição dos grânulos de PHAs, só foi identificada por Lemoigne em 1927, no Instituto Pauster, que verificou que em *Bacillus megaterium* a degradação anaeróbica de um material desconhecido, levava à excreção de ácido 3-hidroxiбутírico (VOLOVA, 2004). Esse material foi identificado como um homopolíéster de hidroxiácido, 3-hidroxiбутirato ou poli(3-hidroxiбутirato) P(3HB) (BRAUNEGG et al., 1998).

Os PHAs podem ser produzidos por uma grande variedade de microrganismos procarióticos. São acumulados pela célula microbiana na forma de grânulos (Figura 7) como substâncias naturais de reserva de carbono e de energia, podendo chegar ao nível de 90 % de seu peso seco (Figura 8). Estas inclusões são geralmente esféricas, com diâmetros médios de 0,2-0,7 μm , e são circundados por uma membrana composta por cerca de 2 % de proteínas e 0,5 % de lipídios cuja espessura é de 2 nm (MADISON e HUISMAN, 1999; SUDESH et al., 2000). Os grânulos são envoltos por uma camada fosfolipídica, por polimerases, despolimerases e proteínas citosólicas não específicas. A função da monocamada fosfolípídica ainda não está bem estabelecida, embora se suponha que ela seja necessária para evitar a transição do poliéster do estado amorfo para o estado mais estável - forma cristalina. Supõe-se ainda que a monocamada fosfolípídica aja como uma barreira protetora evitando danos celulares causados pela interação de PHAs com estruturas internas ou com proteínas citosólicas (LUENGO et al., 2003).

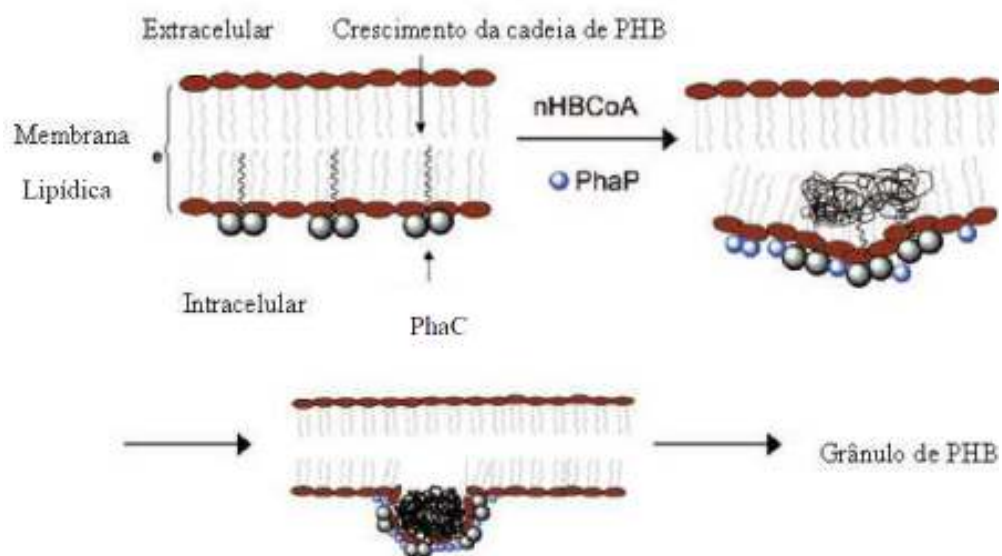


Figura 7: Formação de grânulo de P(3HB) intracelular na membrana lipídica (TIAN et al., 2005).

Em geral, a síntese dos polímeros de PHAs por bactérias em um meio nutritivo, ocorre quando há excesso de fonte de carbono e a limitação de pelo menos um nutriente necessário à multiplicação das células, sendo eles: Nitrogênio (N), Fósforo (P), Magnésio (Mg), Ferro (Fe), entre outros. (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995; BRANDL et al., 1990).

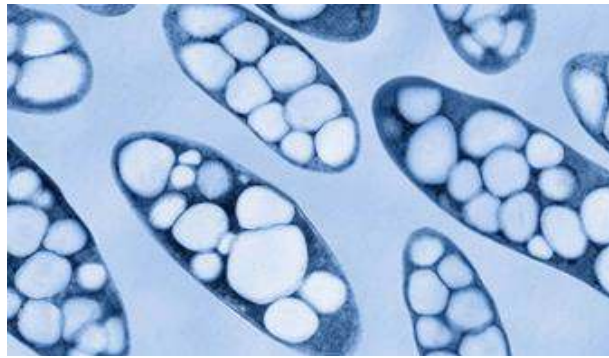


Figura 8: Células bacterianas contendo grânulos de polímero biodegradável, da família dos polihidroxicanoatos (PHAs) no seu interior (micrografia eletrônica de varredura) (SILVA et al., 2007).

Estes polímeros de PHAs apresentam características muito interessantes como propriedades termoplásticas e físico-químicas muito similares aos vários polímeros de origem petroquímica. São completamente biodegradáveis e biocompatíveis, produzidos a partir de matérias-primas renováveis, podendo ser reciclados e incinerados sem a geração de produtos tóxicos, o que os torna de grande aplicabilidade em relação aos polímeros petroquímicos e possíveis candidatos à sua substituição (BYROM, 1987; HÄNGGI, 1995; STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998).

O termo PHA é aplicado a uma variada família de poliésteres mostrada na Tabela 2.

Tabela 2: Estrutura geral dos PHAs e diferentes radicais que podem compor os monômeros dos polímeros (LEE, 1996).

$\left[\text{— O — CH — (CH}_2\text{)}_n \text{ — C —} \right]_{100-3000}$ <div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center; gap: 20px;"> <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} \\ \text{R} \end{array}$ </div> <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} \\ \text{O} \end{array}$ </div> </div>		
n = 1	R = hidrogênio	Poli (3-hidroxiopropionato)
	R = metil	Poli (3-hidroxiobutirato)
	R = etil	Poli (3-hidroxi valerato)
	R = propil	Poli (3-hidroxi hexanoato)
	R = pentil	Poli (3-hidroxi octanoato)
	R = nonil	Poli (3-hidroxi dodecanoato)
n = 2	R = hidrogênio	Poli (4-hidroxi butirato)
	R = metil	Poli (4-hidroxi valerato)
n = 3	R = hidrogênio	Poli (5-hidroxi valerato)
	R = metil	Poli (5-hidroxi hexanoato)
n = 4	R = hexil	Poli (6-hidroxi dodecanoato)

Os constituintes de PHAs podem ser monômeros de cadeia curta, que compreendem os monômeros que contém de 3 a 5 átomos de carbono na cadeia principal; de cadeia média, que compreendem os monômeros que contem de seis a dezesseis átomos de carbono na cadeia principal; e os de cadeia longa, que compreendem os monômeros com dezessete ou mais átomos de carbono na cadeia principal. Dentre todas as possibilidades, os PHAs mais estudados e produzidos industrialmente, são o Poli(3-hidroxi-butirato) P(3HB) e o Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) P(3HB-co-3HV), que é mais atrativo para fins industriais devido as excelentes propriedades mecânicas (BYROM, 1987; SQUIO e ARAGÃO, 2004).

4.1 Propriedades dos PHAs

Os PHAs compartilham diferentes propriedades, de acordo com sua composição monomérica. Eles são substâncias lipofílicas, e dentro da célula encontram-se como inclusões insolúveis. São biopolímeros termoplásticos ou elastoméricos, exibindo um grau de polimerização de até 30.000, confirmado pelas altas massas molares. Com o aumento no comprimento da cadeia, ou aumento no número de comonômeros em um copolímero, sua elasticidade aumenta (FORMOLO et al., 2003).

Duas características físicas são freqüentemente apontadas nos trabalhos relacionados com a produção de PHAs: massa molar (MM) e propriedades térmicas. A massa molar e a distribuição de massas molares de um polímero constituem-se características importantes para a sua adequação comercial (SIM et al., 1997). No caso do P(3HB), polímeros com massa molar inferior a 4×10^5 Da apresentam suas propriedades mecânicas deterioradas (TAIDI et al., 1995). As propriedades térmicas de um polímero (T_m - Temperatura de fusão, T_g - temperatura de transição vítrea), além de propriedades como cristalinidade e tempo de cristalização, definem algumas propriedades mecânicas do material à temperatura ambiente, sendo também parâmetros úteis para o processamento térmico do material (GOMES, 2000).

A família de PHAs possui grande variedade de propriedades mecânicas, do fortemente cristalino ao elástico, dependendo da composição das unidades monoméricas. A Tabela 3 apresenta uma comparação das propriedades físicas entre diferentes PHAs e o polipropileno.

Tabela 3: Comparação entre as propriedades físicas e térmicas dos vários PHAs e do polipropileno.

Propriedades	P(3HB)	P(HB-HV) ^b	PHO ^c	Polipropileno
Ponto de fusão (°C)	175	145	61	176
Cristalinidade (%)	80	40	30	70
Tensão de cisalhamento (Mpa)	40	32	10	38
Resistência à Ruptura (%)	6	-	300	400

(a) Dados adaptados de (Holmes, 1988; Gagnon, et al.,1992;King, 1982).

(b) P(HB-HV) copolímero contendo 20 mol % C5 e 80 mol % C4 monômeros.

(c) PHO copolímero contendo 4 mol % C10, 86 mol % C8 e 10 mol % C6 monômeros.

FONTE: POIRIER 1995.

Os PHAs mais comuns são polímeros semicristalinos. O grau de cristalinidade depende da composição do polímero: sendo 60-80% para o P(3HB) e decrescendo para 30-40% para o copolímero cujo conteúdo em unidades HV é de 30% (mol/mol) (SERAFIM et al., 2008). As propriedades mecânicas do P(3HB), incluindo Módulo de Young e tensão de cisalhamento, são similares às do polipropileno (PP). O P(3HB) possui resistência aos raios UV superior ao polipropileno e excelente impermeabilidade ao oxigênio (HOLMES, 1985). Os polímeros PHA_{MSC} têm menor nível de cristalinidade e são mais elásticos, tendo aplicações potencialmente diferentes dos PHA_{SSC} (MADISON e HUISMAN, 1999).

Assim, PHAs poderão se constituir, no futuro, em polímeros feitos sob medida para diferentes aplicações. As propriedades de PHAs permitem a obtenção desde materiais rígidos, como o P(3HB), a materiais flexíveis, como PHA_{MCL}.

4.2 Aplicações

As características físicas e químicas dos PHAs lhes conferem um grande potencial de aplicação. Os PHAs podem ser aplicados na confecção de objetos e embalagens descartáveis e biodegradáveis, artefatos usados na medicina, tais como válvulas cardíacas, suturas, implantes ósseos, na engenharia de tecido, sistemas de distribuição de fármacos (CHEN e WU, 2005).

Além disso, podem-se citar diversas aplicações industriais, tais como transportadores biodegradáveis para liberação controlada de fertilizantes, fungicidas, herbicidas e inseticidas, confecção de tubulações para irrigação, redes de pesca, frascos, filmes, recipientes, garrafas e

sacolas, emulsificantes, borrachas, itens de higiene descartáveis, como fraldas e barbeadores, matéria prima para a produção de tintas e adesivos (CHEN, 2009).

Porém, a maioria dos estudos atuais tem como foco as aplicações dos PHAs na área médica como em curativos, grampos e pinos cirúrgicos, seringas, suturas, enxertos de vasos sanguíneos e materiais osteosintéticos, como placas ósseas (GRAGE et al., 2009).

4.3 Microrganismos produtores de PHAs

Os PHAs podem ser sintetizados intracelularmente por uma variedade de microrganismos procariontes, sendo acumulados na forma de grânulos, como uma reserva de carbono e energia ao ser detectado pelo organismo, sob condições adversas ao seu crescimento (KIM e LENZ, 2001), podendo estar associadas a limitações de nutrientes, conforme mostrado na Tabela 4.

Tabela 4: Bactérias e nutrientes cuja escassez pode conduzir à produção de PHAs (BRANDIL et al., 1990).

Microrganismo	Composto Limitante
<i>Alcaligenes latus</i>	Amônia
<i>Azobacter vinelandii</i>	Oxigênio
<i>Azospirillum brasiliense</i> Cd	Amônia, carbono e oxigênio
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Potássio
<i>Cupriavidus necator</i>	Amônia
<i>Pseudomonas sp.</i> K	Amônia, ferro, magnésio, manganês e sulfato
<i>Pseudomonas Oleovorans</i>	Amônia, fosfato, magnésio e sulfato
<i>Rhizobium</i> ORS571	Amônia, magnésio e oxigênio
<i>Rhodobacter Sphaeroides</i>	Amônia, fosfato e sulfato
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Amônia, fosfato e sulfato

O acúmulo de PHAs por microrganismos pode ser estimulado sobre condições desequilibrada de crescimento, ou seja, quando fontes de nitrogênio, fósforo ou sulfato são limitantes; e quando a concentração de nitrogênio é baixa ou a razão C:N é e alta (JEYASEELAN et al., 2012).

Alguns fatores como habilidade para utilizar fontes de carbono, velocidades de crescimento e síntese de polímero e o máximo acúmulo de produto, devem ser levados em consideração na seleção do microrganismo. Bactérias como *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, metilotrofos, *Pseudomonas* e *Escherichia coli* e recombinantes de algumas destas, tem sido amplamente utilizadas para a produção de PHAs (BYROM, 1987). As bactérias produtoras de PHAs encontram-se divididas em 2 grupos. No primeiro, ao menos um dos nutrientes necessários ao desenvolvimento normal de ciclo de vida seja limitado para produzir PHAs, por exemplo, *Pseudomonas oleovorans*. No segundo grupo, as bactérias acumulam PHAs durante a fase de crescimento, como é o caso da *Alcaligenes latus*, *Escherichia Coli* e *Azotobacter vinelandii*.

4.3.1 *Cupriavidus necator*

Cupriavidus necator, uma espécie de microrganismo procariótico, do tipo gram-negativo, encontrado naturalmente no solo e água, antigamente recebia as denominações de: *Hydrogenomonas eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha*. Esta espécie possui células na forma de bastonete, é móvel, tendo de 1 a 4 flagelos peritriquiaes. Na fase estacionária de crescimento, ou seja, no acúmulo de polímero, as células podem se tornar esféricas (BRAUNEGG et al., 1998). A Figura 9 apresenta a bactéria em fase de crescimento e em fase de acúmulo de polímero.

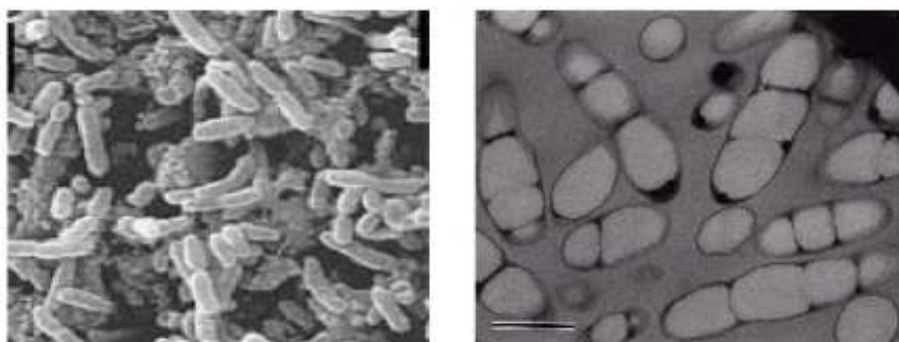


Figura 9: *Cupriavidus necator* em fase de crescimento e de produção (AMPE, 1995; SUDESH et al., 2000).

Segundo TANAKA et al. (1994), a bactéria *Cupriavidus necator*, produz o polímero de alta massa molar, utilizando uma variedade de compostos orgânicos como fonte de carbono, entre os quais estão incluídos glicose, frutose, formiato, acetato, propionato, lactato, glutamato, succinato, fenobenzoato, entre outros. As bactérias podem crescer autotroficamente em atmosfera de gases H₂, O₂ e CO₂.

A literatura cita temperaturas ótimas de crescimento entre 30 - 34°C (MARANGONI, 2000; GROTHE et al., 1999), e a maioria dos estudos são realizados a 30°C. Contudo, de acordo com um estudo comparativo para síntese celular e produção de polímero, desenvolvido por FIORESE (2008), 35°C é a temperatura que favorece o crescimento de *Cupriavidus necator*. Excelentes resultados em cultivos também foram obtidos a 35°C, por FARIAS (2009) com valores de $\mu_{\text{máx}}$ 0,1907 h⁻¹, IENCZAK (2011) 0,19 h⁻¹, entre outros como QUINES (2010).

GOMEZ et al. (1997) em estudos relatam que o pH ideal de bactérias produtoras de P(3HB) tanto para o crescimento como o acúmulo, é da ordem de 7,0. O acúmulo de PHAs, na forma de grânulos, em *Cupriavidus necator*, geralmente ocorre quando existe excesso de fonte carbono e limitação de algum nutriente essencial à multiplicação. Esta síntese ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, procura-se favorecer ao máximo o crescimento celular e assegurar, ao mesmo tempo, que a síntese do polímero seja a menor possível. Na segunda etapa, o processo é feito inversamente, interrompe-se o crescimento celular e estimula-se ao máximo o acúmulo do polímero no interior da célula (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997). Entretanto, FIORESE (2008) salienta que o biopolímero pode sofrer degradação intracelular ocorrendo, via de regra, em condições de cultura opostas àquelas onde se observa o seu acúmulo, ou seja, em situações onde haja pouca disponibilidade da fonte de carbono, e não haja limitação de outras necessidades nutricionais.

A Figura 10 mostra a evolução de crescimento e de acúmulo de polímero P(3HB) ao longo de 24 h de cultivo.

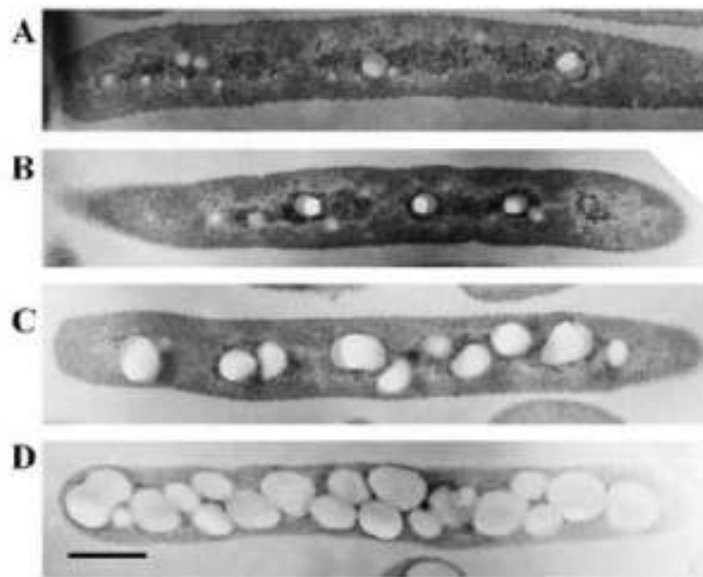


Figura 10: Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) de *Cupriavidus necator* durante produção de P(3HB) 2,5 h (A), 5 h (B), 9 h (C) e 24 h (D), mostrando o "desaparecimento" dos elementos de mediação e dando espaço aos grânulos intracelulares de P(3HB). O tamanho final dos grânulos de P(3HB) após 24 h é de 0,5 μm (TIAN et al., 2005).

Por possuir elevado rendimento e velocidade de produção, o *Cupriavidus necator* tem sido o microrganismo mais utilizado na produção industrial de PHAs (RAMSAY et al., 1990), além de acumular cerca de 80 % de sua massa seca em polímero também pode utilizar fontes renováveis de carbono. Diversos substratos podem ser metabolizados por *Cupriavidus necator* para a produção de PHAs. Pode-se enfatizar subprodutos agroindustriais como cana-de-açúcar (KULPREECHA et al., 2009), bagaço de maçã (RODRIGUES, 2005b), soro de leite (MARANGONI et al., 2002), hidrolisado de amido (DALCANTON et al., 2010), melaço cítrico (FIORESE, 2004), bem como os substratos utilizados convencionalmente para produção de PHAs, glicose e frutose (KHANNA e SRIVASTAVA, 2007; ATLIĆ et al., 2011; CHAKRABORTY et al., 2012)

4.3.2 Metabolismo do *Cupriavidus necator* – Síntese do P(3HB)

O processo de produção de P(3HB) utilizando *Cupriavidus necator* é realizado em cultivos caracterizados pela existência de duas fases: uma primeira fase, onde se emprega um meio contendo substratos como açúcares e nutrientes essenciais para o crescimento sem haver

limitações; e uma segunda fase onde o meio deve conter excesso de fonte de carbono e apresentar uma carência ou limitação nutricional preferencialmente em fontes de nitrogênio, capaz de direcionar o metabolismo das bactérias para a síntese e acúmulo do biopolímero.

De acordo Lamaison (2009), dentre os nutrientes que compõem o meio fermentativo para atender às necessidades de desenvolvimento do microrganismo estão o nitrogênio (N) e o fósforo (P) que são essenciais para o crescimento bacteriano.

O nitrogênio desempenha um papel particularmente importante, pois todos os organismos vivos o necessitam para formar as proteínas; por outro lado, o excesso deste elemento pode provocar toxicidade do substrato pela produção de amoníaco (HANSEN et al., 1998).

Conforme citado por OLIVEIRA e NOGUEIRA (1984), o enxofre é necessário para a síntese de aminoácidos, e o fósforo é encontrado nos ácidos nucleicos, fosfolipídios e ATP. No processo de digestão anaeróbia, o enxofre é menos importante do que o fósforo. A quantidade presente no substrato deve por isso ser limitada, para evitar um desenvolvimento acentuado das bactérias redutoras de sulfato e conseqüente transformação do enxofre em sulfureto de hidrogênio. Os elementos, potássio (K), o cálcio (Ca), o magnésio (Mg) e o ferro (Fe) são necessários para manter a atividade enzimática do processo e também como constituintes de complexos metálicos. Deve-se levar em consideração os teores de metais pesados e de produtos tóxicos que podem originar a morte de microrganismos metanogênicos. Quantidades excessivas de amoníaco dissolvidas nos excrementos líquidos também podem inibir o cultivo. Torna-se, por isso necessário efetuar uma diluição, principalmente dos substratos com elevado teor de nitrogênio.

Os monossacarídeos, glicose e frutose são açúcares redutores, que por possuírem grupo carbonílico e cetônico livres são facilmente metabolizados por *Cupriavidus necator*. A via de degradação destes carboidratos é a via *Entner-Doudoroff*, mais frequentemente utilizada pelo microrganismo, resultando na formação de piruvato, o qual é oxidado e descarboxilado a acetil coenzima A (acetil-CoA).

Desta forma, a fase de crescimento celular é composta por duas fases: lag e log. A fase lag, de adaptação interna da célula ao novo meio de cultura, corresponde à indução das enzimas necessárias para metabolizar os nutrientes. A síntese de RNA é iniciada logo no início do contato da célula com o novo meio e posteriormente ocorre a síntese de proteínas. Em seguida, são iniciadas as sínteses de polissacarídeos e de fosfolipídeos, que permitirão

aumentar o volume celular e a massa da célula. A síntese de DNA ocorre somente no final da fase lag. A biomassa é constante ($X_t = X_0$). A fase log, correspondente ao crescimento logarítmico das células, onde nenhum fator externo ou componente do meio é limitante para o crescimento microbiano, é constituída por células plenamente adaptadas, absorvendo os nutrientes, sintetizando os constituintes, crescendo e duplicando-se. A velocidade de crescimento μ é dada por dX/dt , sendo constante (USP, 2009).

As condições sob as quais a síntese de proteínas cessa e as células iniciam os processos de síntese e acúmulo de P(3HB) são determinadas pelo estado redox do citoplasma e pela concentração intracelular de piruvato e CoA disponível (SENIOR e DAWES, 1971). Durante o crescimento balanceado (Figura 11), o piruvato e os equivalentes redutores (NADH e NADPH) são geralmente despendidos no ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA), sendo terminalmente oxidado a CO_2 para formação de aminoácidos e geração de energia na célula, na forma de ATP. O nível de CoA disponível permanece alto, dificultando a síntese do P(3HB). Em condições de crescimento desbalanceado e de limitação de algum nutriente essencial ao crescimento, o piruvato não entra no TCA, mas é descarboxilado, formando acetil-CoA. Assim, o nível de CoA disponível é reduzido, favorecendo a ativação do ciclo de enzimas que sintetizam o P(3HB) (BRAUNEGG et al., 1998; VOLOVA, 2004).

O P(3HB) é sintetizado em *Cupriavidus necator* e em muitos microrganismos, a partir do acetil-CoA, em condições de excesso da fonte de carbono e limitação de algum nutriente essencial, por uma sequência de 3 reações catalisadas pelas enzimas 3- β -cetotiolase, acetoacetil-CoA redutase e PHA sintase (SQUIO, 2003).

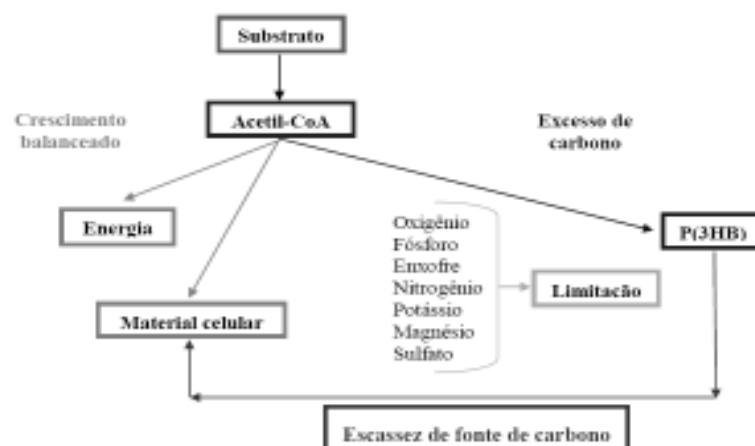


Figura 11: Produtos do acetil-CoA em condições de crescimento balanceado e de excesso e escassez de carbono (SQUIO, 2003).

A primeira enzima, β -cetotiolase, condensa, reversivelmente, duas moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA. Esta molécula é então reduzida, através da ação da enzima acetoacetil-CoA redutase NADPH dependente, à R-3-hidroxybutiril-CoA, que é incorporada à cadeia de polímero pela ação da enzima PHA sintase (SUDESH et al., 2000). A rota de produção e degradação intracelular de P(3HB) por *Cupriavidus necator* pode ser visualizada na Figura 12..

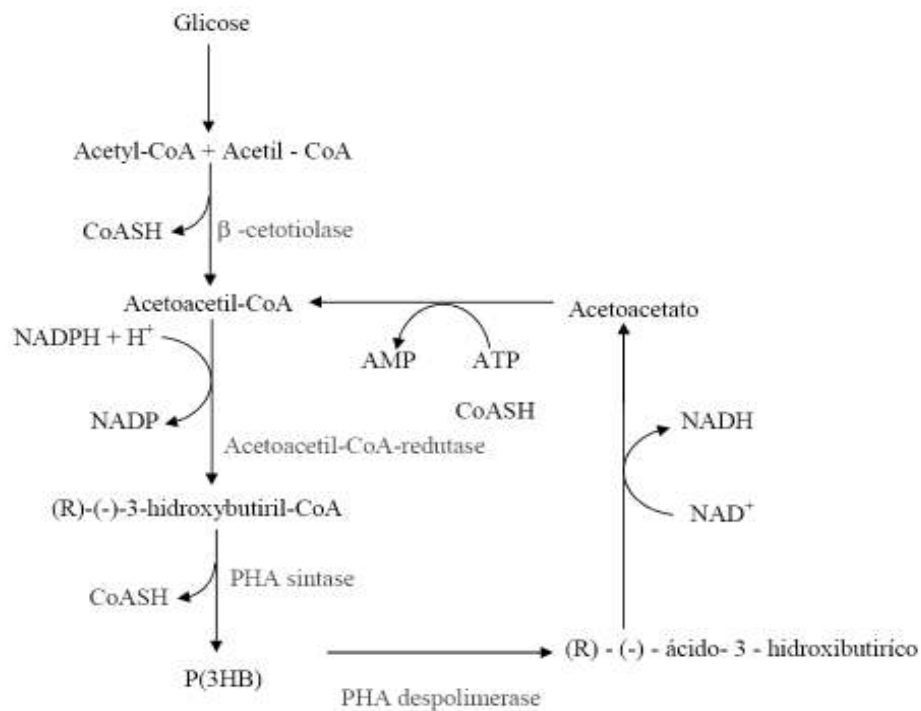


Figura 12: Síntese de P(3HB) a partir de acetil-CoA por *Cupriavidus necator* (RODRIGUES, 2002).

4.4 Resíduos agroindustriais para produção de PHAs

Dentre os custos operacionais, os gastos com o substrato é o que mais contribui para os altos valores registrados na síntese de PHAs, como pode ser verificado no estudo de Wegen et al. (1998), no qual o substrato representou 39% dos custos de produção de PHAs. Nonato et al. (2001) ao analisarem a produção de P(3HB) com uma planta industrial com capacidade de 10.000 toneladas/ano, utilizando como fonte de carbono a sacarose, obtiveram

o valor de 29% dos custos referentes a fonte de carbono. Outros dados também mostram a grande contribuição dos substratos para a composição dos custos totais, que podem representar de 35 - 40% (Page et al., 1995, 1996; Posada et al., 2011). Kim (2000) e Van-Thuoc et al. (2008) afirmam que estratégias de produção de PHAs a partir de fontes de carbono de baixo custo são imprescindíveis para a viabilidade econômica desta atividade.

Os PHAs são produzidos comercialmente a partir da glicose ou frutose, que também são substratos utilizados em diversas aplicações na indústria de alimentos, aumentando assim a demanda por açúcares, fazendo com que o custo de produção esteja sempre elevado. O alto custo de produção de PHAs pode ser minimizado usando resíduos orgânicos industriais e/ou agroindustriais. O termo resíduo é utilizado em sentido amplo, englobando não somente sólidos como também os efluentes líquidos e os materiais presentes nas emissões atmosféricas. O resíduo industrial, depois de gerado, necessita de destino adequado, pois não pode ser acumulado indefinidamente no local em que foi produzido.

De acordo com IENCZAK (2006), as fontes de carbono renováveis na produção de PHAs são principalmente originadas de subprodutos de agroindústrias. Essas fontes são os principais componentes da DBO e DQO nas estações de tratamento de efluentes (ETE) de agroindústrias e, portanto, uma forma de solucionar ambos os problemas de redução de custos na produção de PHAs e nas ETES está no uso destes subprodutos como substrato principal para a produção biotecnológica de PHAs. Nesse contexto, diversas matérias-primas de baixo custo classificadas como recursos renováveis podem ser excelentes fontes de carbono para tal aplicação. Por exemplo, destacam-se o uso de resíduo de malte (LAW et al., 2003), resíduo de fécula de batata (HAAS et al., 2008), bagaço de cana de açúcar (YU e STAHL, 2008), farelo de milho, farelo de trifo, bagaço de mandioca, pó de caroço de jaca, fécula de batata, torta de óleo de gergelim e torta de óleo de amendoim (RAMADAS et al., 2009), soro de leite (BOSCO e CHIAMPO, 2010) e hidrolisado de amido de arroz (DALCANTON et al., 2010).

Na Tabela 5, são apresentados alguns substratos alternativos que já foram utilizados para obtenção de PHAs por diversos microrganismos, as respectivas condições de fermentação, bem como os valores de produção do polímero.

Tabela 5: Diferentes substratos alternativos, microrganismos e condições de fermentação para produção de PHAs.

Substrato	Microrganismo	Condições de produção	Produção de Biomassa (g.L ⁻¹)	Produção de PHAs (g.L ⁻¹)	Referência
Resíduo de malta	<i>Bacillus magaterium</i>	Biorreator, 250 rpm, 37°C, pH 7, 15h	2,24	0,43	LAW et al., 2003
Resíduo de Fécula de batata	<i>Ralstonia eutropha</i>	Biorreator, 1000 rpm, 30°C, pH 6,8 a 72h	179,00	94,00	HASS et al., 2008
Bagaço de cana de açúcar	<i>Ralstonia eutropha</i>	Agitador orbital, 200 rpm, 30°C, pH 7,5, 48h	11,10	6,27	YU e STAHL., 2008
Farinha de milho	<i>Bacillus sphaericus</i>	Agitador orbital, 200 rpm, 30°C, ph 7, 24h	1,50	0,05	RAMADAS et al., 2009
Farelo de trigo	<i>Bacillus sphaericus</i>	Agitador orbital, 200 rpm, 30°C, ph 7, 24h	15,50	1,07	RAMADAS et al., 2009
Bagaço de mandioca	<i>Bacillus sphaericus</i>	Agitador orbital, 200 rpm, 30°C, ph 7, 24h	2,50	0,16	RAMADAS et al., 2009
Pó de caroço de jaca	<i>Bacillus sphaericus</i>	Agitador orbital, 200 rpm, 30°C, ph 7, 24h	1,50	0,69	RAMADAS et al., 2009
Fécula de batata	<i>Bacillus sphaericus</i>	Agitador orbital, 200 rpm, 30°C, ph 7, 24h	1,50	0,71	RAMADAS et al., 2009
Torta de óleo de gergelim	<i>Bacillus sphaericus</i>	Agitador orbital, 200 rpm, 30°C, ph 7, 24h	1,00	0,15	RAMADAS et al., 2009
Torta de óleo de amendoim	<i>Bacillus sphaericus</i>	Agitador orbital, 200 rpm, 30°C, ph 7, 24h	1,50	0,28	RAMADAS et al., 2009
Soro de leite	<i>Methylobacterium sp.</i>	Agitador orbital, 120 rpm, 30°C, pH 7, 92h	1,62	0,22	BOSCO e CHIAMPO, 2010
Hidrolisado de amido de arroz	<i>Cupriavidus necator</i>	Agitador orbital, 150 rpm, 35°C, pH 7, 24h	12,40	4,34	DALCANTON et al 2010
Variação			1,00 – 179,00	0,05 – 94,00	

Além de criar potenciais problemas ambientais, os resíduos representam perdas de matérias-primas e energia, exigindo investimentos significativos em tratamentos para controlar a poluição. A indústria produz ao longo de sua cadeia uma grande quantidade de resíduos, o que gera perda de divisas. Segundo LAUFENBERG et al. (2003) e PELIZER et al. (2007), os resíduos podem conter inúmeras substâncias de alto valor, que se empregada uma tecnologia adequada, podem ser convertidos em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários.

De acordo com PANDEY et al. (2000), houve um crescente interesse na biotransformação de resíduos, tendo em vista, serem materiais de baixo custo e altamente renováveis. Deste modo, a utilização de resíduos, além de diminuir o impacto sobre o meio ambiente, devido à disposição inadequada, pode ser um fator importante para a produção de subprodutos e de menores custos de produção.

Conforme PELIZER et al. (2007), a preocupação com o meio ambiente leva à viabilização de projetos que levam à sustentabilidade do sistema de produção industrial. Muitos países entre eles o Brasil estão realizando estudos de gerenciamento e diminuição do volume de lixo sólido, buscando ainda a produção de materiais polímeros biodegradáveis, a partir de fontes renováveis de carbono. Estes novos materiais devem possuir as propriedades desejáveis dos polímeros convencionais, serem produzidos a partir de substratos renováveis e ainda serem completa e rapidamente biodegradados quando descartados no meio ambiente (LEE et al., 2002; HUANG e EDELMAN 1995; FRANCHETTI e MARCONATO, 2006).

4.4.1 Glicerina bruta residual do biodiesel

A glicerina bruta é um subproduto da cadeia do biodiesel, que surgiu mundialmente como uma alternativa promissora aos combustíveis minerais, derivados do petróleo e sua produção se encontra em constante aumento em todo o mundo, inclusive no Brasil. Sua obtenção mais comum ocorre a partir da transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com álcoois por meio de catálise alcalina ou ácida (SALAMATINIA et al., 2010) (Figura 13). Durante este processo, os ésteres metílicos são separados conforme o produto desejado, enquanto a glicerina é separada como sub-produto. A glicerina bruta, normalmente é gerada na razão de um mol para cada três moles de ésteres metílicos produzidos (MELERO et al., 2012).

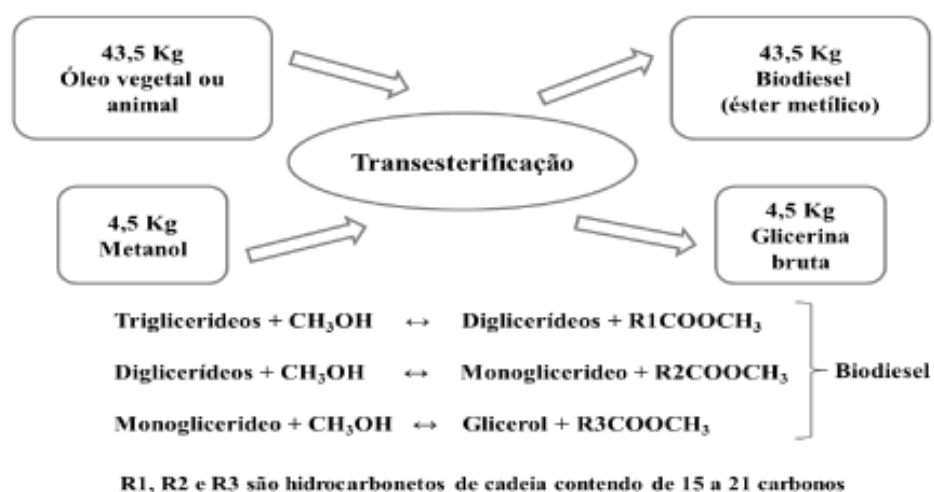


Figura 13: Formação de glicerina bruta durante o processo de transesterificação Adaptado de Ayoub e Abdullah (2012).

A glicerina é o maior co-produto do processo de obtenção do biodiesel. Em geral, aproximadamente 4,53 Kg de glicerina bruta são gerados para cada 45,3 Kg de biodiesel produzido (CARDONA et al., 2007). Atualmente, os Estados Unidos é o maior produtor de biodiesel do mundo, seguido da Alemanha e Brasil (CELULOSE LINE, 2013). O consumo anual de biodiesel nos Estados Unidos era de 15 bilhões de litros em 2006. Contudo a produção vem crescendo a uma taxa de 30 – 50% por ano, atingindo um valor de 30 bilhões de litros no final de 2012 (USEPA, 2007). De acordo com o relatório da National Biodiesel Board, havia 105 usinas de biodiesel em operação nos estados Unidos em 2007 e outras 77 em fase de planejamento ou construção forem instaladas, a expectativa de produção de biodiesel nos estados Unidos será superior a 9,5 bilhões de litros. De acordo com Ayoub e Abdullah (2012) para este nível de produção de biodiesel, gera-se cerca de 1,2 milhões de toneladas de glicerina bruta. Neste contexto, estima-se que, entre 2008 e 2013, a indústria de biodiesel do Brasil terá produzido glicerina na ordem de 80.000 – 150.000 toneladas por ano (DA SILVA et al., 2009; ALBARELLI et al., 2011). Porém, mundialmente o mercado do biodiesel alcançará em torno de 37 bilhões de galões até 2016 e 4 bilhões de galões de glicerina bruta serão produzidas (ANAND e SAXENA, 2011). Como a demanda e a produção de biodiesel cresce exponencialmente, a utilização deste resíduo torna-se indispensável.

A glicerina oriunda do biodiesel tem elevado teor de impurezas e o custo para sua purificação inviabiliza a utilização em indústrias de cosmético, alimentos e farmacêutica (THOMPSON e He, 2006; ÇELIK et al., 2008). Por isso, torna-se importante desenvolver novas aplicações para a glicerina residual do biodiesel (bruta ou loira) e/ou purificada visando atenuar os possíveis impactos causados pela crescente produção de biodiesel (AZEVEDO e LIMA, 2001). De acordo com Johnson e Taconi (2007); Da Silva et al. (2009) uma alternativa promissora para este subproduto é a conversão microbiana por processos biotecnológicos em produtos de valor agregado como polihidroxibutirato (ZHU et al., 2010); ácido clavulânico (TEODORO et al., 2010); eritropoietina humana recombinante (ÇELIK et al., 2008), ácido cítrico (PAPANIKOLAOU et al., 2002; RYWIŃSKA et al., 2011) e produção de goma xantana: Patente brasileira PI0705950-7 (BRANDÃO et al., 2008; REIS et al., 2010).

A utilização da glicerina bruta como substrato para a produção de PHAs tem uma repercussão bastante promissora, contribuindo para a diminuição dos custos de produção do biopolímero que possui grande aplicação industrial, além de contribuir também com a destinação dos resíduos gerados. Por isso recentemente, muitos estudos têm focado no uso deste substrato na forma bruta para a produção dos PHAs por meio de diversos microorganismos (Tabela 6).

Posada et al. (2011) ao simularem a avaliação econômica da produção de PHAs, utilizando o glicerina bruta, relatam que a redução dos custos de produção são menores do que 8%, com preço do biopolímero variando entre 2,1 a 2,4 US\$/kg. A baixa redução no custo foi justificada em decorrência das impurezas (sais, ésteres, álcool) contidas no glicerol bruto que afetam os processos metabólicos do microrganismo produtor.

Tabela 6: Microrganismos, condições de produção, valores de biomassa e de PHAs, propriedades e dados cinéticos da produção de PHAs a partir da glicerina bruta do biodiesel.

Microrganismo	Condições de produção	Produção de Biomassa (g.L ⁻¹)	Produção de PHAs (g.L ⁻¹)	Propriedades do biopolímero	Dados cinéticos obtidos	Referência
<i>Escherichia coli</i>	Biorreator: 75 rpm, 1 vvm, pH 7,2, 37°C, 48h	4,36	0,7	---	$\mu_{\max} = 0,6 \text{ h}^{-1}$	NIKEL et al., 2006
<i>Escherichia coli</i>	Biorreator: 1000 rpm, 1 vvm, pH 7,2, 37°C, 48h	8,0	3,1	$T_m = 169,8^\circ\text{C}$ $T_g = 1,3^\circ\text{C}$ Cristalinidade = 52,6%	$\mu_{\max} = 0,6 \text{ h}^{-1}$ $Y_{p/s} = 0,1$	ALMEIDA et al., 2007
<i>Paracoccus denitrificans</i>	Biorreator: pH 7, 35°C, 50h	9,23	6,0	MM = 750 KDa $T_m = 169^\circ\text{C}$ $T_g = 10^\circ\text{C}$	$Y_{p/s} = 0,37$	MOTHES et al., 2007
<i>Cupriavidus necator</i>	Biorreator: pH 7, 35°C, 50h	4,46	3,12	MM = 620 KDa $T_m = 173^\circ\text{C}$ $T_g = 10^\circ\text{C}$	$Y_{p/s} = 0,32$	MOTHES et al., 2007
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Biorreator: 200 rpm, 0,5 vvm, 33°C	1,4	0,5	---	$Y_{p/s} = 0,11$ $\mu_{\max} = 0,36 \text{ h}^{-1}$	PAPANIKOLAOU et al., 2008
<i>Cupriavidus necator</i>	Biorreator: 1500 rpm, 3,6 vvm, pH 6,8, 34°C, 26h	13,5	4,2	MM = 960 KDa Monômero = 22% 4HB	$Y_{p/s} = 0,03$ $Y_{x/s} = 0,42$	CAVALHEIRO et al., 2009
<i>Zobellella denitrificans</i>	Biorreator: 800 rpm, 1,67 vvm, pH 7,3, 41°C, 24h	29,9	9,28	---	$\mu_{\max} = 0,35 \text{ h}^{-1}$ $Y_{p/s} = 0,1$	IBRAHIM e STEINBUCHER, 2009 ^a
<i>Zobellella denitrificans</i>	Agitador orbital: 200 rpm, 41°C, 96h	3,52	2,82	---	$Y_{p/s} = 0,3$	IBRAHIM e STEINBUCHER, 2009 ^b
<i>Burkholderia cepacia</i>	Agitador orbital: 150 rpm, pH 7,0, 30°C, 96h	5,8	4,75	MM = 304 KDa $T_m = 181,9^\circ\text{C}$ $T_g = 1,6^\circ\text{C}$ $T_{\text{decomp}} = 281,5^\circ\text{C}$	---	ZHU et al., 2009
<i>Escherichia coli</i>	Biorreator: 400 rpm, 2,5	5,15	0,27	MM = 89 KDa	---	ANDREZBEN et al., 2010

	vvm, pH 6,7, 37°C, 92h			Monômero = 42% 3HP		
<i>Halomonas sp</i>	Agitador orbital: 150 rpm, pH 7, 30°C, 60h	4,1	1,6	MM = 140 KDa	---	KAWATA e ALBA, 2010
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Biorreator: 250 rpm, 2 vvm, pH 7, 30°C, 96h	3,0	1,14	MM = 314 KDa	---	ASHBY et al., 2011
Mix de microrganismos consorciados	Biorreator: 500 rpm, 1 vvm, pH 7, 30°C, 120h	9,6	1,0	MM = 380 KDa T _m = 175°C T _g = 5°C Cristalinidade = 65%	Y _{p/s} = 0,07	DOBROTH et al., 2011
Mix de microrganismos consorciados	Biorreator: 1 vvm, pH 7, 30°C, 24h	0,57	0,2	---	Y _{p/s} = 0,35 Y _{x/s} = 0,08 q _{PHA} = 0,34	MORALEJO et al., 2011
<i>Cupriavidus necator</i>	Biorreator: 1600 rpm, 2 vvm, pH 6,8, 34°C, 42h	76,0	38,1	MM = 78,6 KDa	Y _{p/s} = 0,34 Y _{x/s} = 0,45	CAVALHEIRO et al., 2012
<i>Ralstonia eutropha</i>	Biorreator: 30°C, pH 7, 72h	4,2	2,0	MM = 357 KDa	---	GOZKE et al., 2012
<i>Cupriavidus necator</i>	Agitador orbital: 250 rpm, pH 7, 30°C, 120h	15,12	7,01	Monômero = 97% 3HB e 3% 3HV T _m = 155°C T _g = -1,9°C T _{decomp} = 271°C Cristalinidade = 49%	---	GARCIA et al., 2013
Mix de microrganismos consorciados	Biorreator: 400 rpm, 1 vvm, pH 7, 30°C, 48h	0,476	0,27	---	Y _{p/s} = 0,48 Y _{x/s} = 0,52 q _{PHA} = 0,33	MORALEJO et al., 2013
<i>Bacillus megaterium</i>	Biorreator: 300 rpm, 1,2 vvm, 33°C, 40h	5,7	3,4	---	Y _{p/s} = 0,3	NARAJO et al., 2013

MM – Massa molar; T_m – Temperatura de decomposição, T_g – Temperatura de transição vítrea, T_{decomp} – Temperatura de decomposição, μ_{max} – Velocidade específica máxima de crescimento, Y_{p/s} – Fator de conversão de substrato em produto, Y_{x/s} – Fator de conversão de substrato em biomassa, q_{PHA} – velocidade de consumo, HP – hidroxipropanoato, HB – hidroxibutirato, HV – hidroxivalerato.

4.5 Processos fermentativos

Segundo Schmidell (2001) se os agentes das transformações são microrganismos vivos, de modo que as reações que se desenvolvem no reator são conseqüências da atividade vital das células microbianas, o processo é denominado processo fermentativo.

Reguly (2000), classifica os processos fermentativos em função da condução (contínua ou descontínua) e do modo de cultivo (fermentação em superfície ou em profundidade). Processo fermentativos em superfície, ou estado sólido, são aqueles em que tanto o crescimento do microrganismo como a formação do produto acontecem no meio sólido ou semi-sólido. No processo em profundidade, ou submerso, o crescimento do microrganismo e a formação do produto se desenvolvem em meio nutritivo líquido.

Stredanski et al. (1999) relatam que a produção de biopolímeros em cultivo sólido é maior do que submerso justificado pela limitação de oxigênio no cultivo submerso devido ao aumento da viscosidade do caldo, dificultando assim a eficiência da mistura e distribuição de oxigênio. A fermentação em meio sólido permite solucionar problemas relacionados à viscosidade do caldo além da possibilidade de utilizar substratos baratos, como subprodutos industriais.

O processo fermentativo descontínuo (batelada) é o mais empregado para obtenção de vários produtos fermentados (WANG et al., 1979; CRUEGER e CREGER, 1984), inclusive para a fermentação de glicerina para produção de PHAs conforme constatado na Tabela 6. Este tipo de processo fermentativo possui vantagens sobre os demais, no que tange a possíveis contaminações, uma vez que não são adicionados substratos no decorrer do processo. Desvantagens ficam por conta da produtividade menor já que o processo contínuo é mais dinâmico devido a adição constante e contínua dos substratos.

O modo de operação do processo de fermentação descontínuo inicia quando a solução nutriente esterilizada é inoculada com o microrganismo e incubada no agitador orbital/biorreator, de modo que o processo fermentativo ocorra sob condições controladas e seguras. No decorrer do processo fermentativo nada é adicionado, exceto oxigênio (no caso de processos aeróbicos), antiespumante, e ácido ou base para controle de pH. Finalizado o processo, descarrega-se o agitador orbital/biorreator, e o meio fermentado segue para os tratamentos finais (MAIORELLA et al., 1981).

4.5.1 Processo de produção de PHAs

A produção de PHAs conduzida em fermentação contínua tem sido reportada por numerosos estudos (Khanna e Srivastava, 2007; Troeger e Harvey, 2009; Atlíć et al., 2011), embora as mais altas produtividades tenham sido obtidas em fermentação contínua, a maior parte, senão a totalidade, desde a produção comercial até as de laboratórios são realizadas empregando-se o processo descontínuo ou batelada (Marsudi et al., 2008; Kulpreecha et al., 2009; Tripathi et al., 2012). Apesar das vantagens da fermentação contínua, o processo é complexo, muitas vezes a agitação é insuficiente e, além disso, é difícil manter a esterilidade do processo (HARDING et al., 1994).

Existem numerosos microrganismos que acumulam PHAs e, portanto, a condição de fermentação ideal para a produção do polímero, bem como o meio de cultivo serão diferentes de um organismo para o outro. Alguns organismos acumulam PHAs em condições de limitação (*Cupriavidus necator*, *Bacillus megaterium*), enquanto outros, como *Alcaligenes latus*, acumulam o polímero durante o crescimento (HRABAK, 1992). É necessário considerar também o metabolismo (síntese e degradação), uma vez que cultivos prolongados podem resultar em uma degradação do PHAs pelas despolimerases (LEE e CHANG, 1995).

A seleção de um organismo para a produção industrial de PHAs deve ser baseada em habilidades como: capacidade da célula em utilizar substratos baratos, velocidade de crescimento, velocidade de síntese do polímero, percentual de acúmulo do polímero. Os três últimos itens afetam diretamente a produtividade, que deve ser elevada. O fator de conversão de substrato em PHAs é também importante, de forma a não se desperdiçar substrato com outro material que não PHAs. Estratégias básicas de produção de PHAs podem ser desenvolvidas com base nos fatores de conversão e produtividade (YAMANE, 1992, 1993).

Embora Repaske e Mayer (1976) já relatassem que o pH ótimo para o crescimento e a produção de P(3HB) por *Ralstonia eutropha* era de 6,9 e que um pH de 5,4 inibia o seu crescimento, Grothe e colaboradores (1999) verificaram a influência do pH inicial (6,0 a 8,5) e da temperatura (25 a 37°C) sobre o crescimento de *Alcaligenes latus* e a produção de P(3HB). Os valores de pH 6,5 e 7,0 e a temperatura de 33°C forneceram os melhores resultados.

Na Tabela 6 observa-se a influência do microrganismo, do sistema de fermentação (agitador orbital e biorreator) e das condições de fermentação (velocidade de agitação, taxa de

aeração, pH, temperatura e tempo) na produção e nas propriedades de PHAs, utilizando a glicerina bruta do biodiesel como único substrato. Foram utilizados diversos microrganismos para a produção do biopolímero e a maioria dos estudos foram realizados em biorreator utilizando processo descontínuo. A produção de PHAs variou de 0,2 a 38,1 g.L⁻¹, sendo que os maiores valores foram obtidos com *Cupriavidus necator* em biorreator descontínuo, utilizando pH 7,0 e temperatura de 30°C. Com relação às propriedades dos PHAs obtidos, a MM variou de 78,6 a 960 KDa, a T_m de 155 a 181,9°C, a T_{decomp} de 271 a 281,5°C e o grau de cristalinidade de 49 a 65%, mostrando a grande influência destas variáveis na produção e propriedades dos biopolímeros acumulados.

4.5.2 Cinética de processos fermentativos

Microrganismos são sistemas complexos e o metabolismo podem adaptar-se a um grande número de condições ambientais (físicas, químicas e nutricionais) e conseqüentemente mostram vários comportamentos. Sendo assim, o crescimento microbiano pode ser analisado a partir de várias perspectivas e com variado grau de complexidade, dependendo da distinção entre células individuais dentro do reator ou do exame das reações metabólicas individuais que ocorrem na célula (SILVA, 2003).

Para muitos microrganismos, a cinética e a eficiência de produção de polímeros, a massa molar e a estrutura podem ser afetados por variações nas condições de crescimento. As relações cinéticas entre o crescimento celular, biomassa, consumo dos substratos e a formação de produtos são importantes para determinar o modo de operação mais econômico.

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste na análise da evolução dos valores das concentrações de um ou mais dos componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação. Esses componentes são: a biomassa (X), os produtos do metabolismo (P) e os substratos que compõem o meio de cultura (S). Uma vez que esses valores de concentração representam parte de um conjunto de dados necessários ao dimensionamento de um processo produtivo, fica evidente que sem o conhecimento da cinética torna-se inviável a transposição de um experimento de laboratório para a escala industrial. Cabe mencionar que a cinética possibilita também uma comparação quantitativa entre as diferentes condições de cultivo (pH, temperatura, etc.), por intermédio de variáveis como: velocidades de transformação e fatores de conversão, obtidos a partir das curvas de

ajuste $X=X(t)$ (concentração de biomassa em função do tempo), $P=P(t)$ (concentração de produto em função do tempo) e $S=S(t)$ (concentração de substrato em função do tempo) (Figura 14), (HISS, 2001).

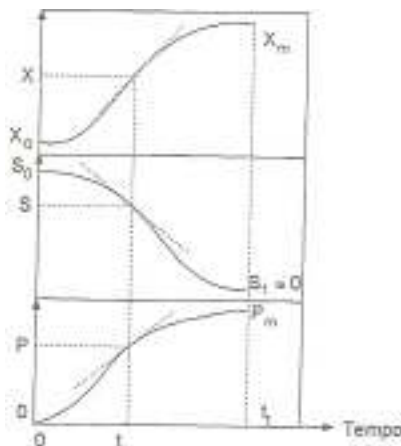


Figura 14: Comportamento das curvas das concentrações de X, P e S de um processo fermentativo em função do tempo (HISS, 2001).

Kahar et al. (2004) produziram P(3HB) a partir da linhagem selvagem de *Ralstonia eutropha* H16 e de uma linhagem recombinante, tendo óleo de soja como única fonte de carbono. Mantendo a concentração de óleo de soja em torno de 20 g.L^{-1} ao longo de todo o processo, e após 96h de cultivo, os autores obtiveram 126 g.L^{-1} de células contendo 76% (m/m) de P(3HB). O fator de conversão para a produção de PHAs a partir de óleo de soja foi de $0,76 \text{ g (PHA)/g}$ óleo vegetal utilizado em função da elevada composição em número de átomos de carbono no óleo vegetal e com valor de produtividade em PHAs calculado em $1 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

A bactéria *Pseudomonas putida* foi cultivada na presença de ácido oléico como única fonte de carbono para obtenção de elevada concentração de PHA_{MCL} . Os ensaios conduzidos em frascos agitados revelaram que o fator de conversão de substrato em células foi igual a $0,6 \text{ g/g}$ (LEE et al., 2000).

Na Tabela 6, pode-se verificar que a produção de PHAs a partir da glicerina bruta do biodiesel utilizando diferentes microrganismos apresenta fatores de conversão do substrato em biopolímero variando de $0,03$ a $0,48 \text{ g/g}$. O fator de conversão substrato em biomassa com variação de $0,08$ a $0,52 \text{ g/g}$, e velocidade específica máxima de crescimento entre $0,35$ a $0,6 \text{ h}^{-1}$, dependendo do microrganismo, sistema de fermentação, composição de meio fermentativo e condições do processo.

CAPÍTULO II

MATERIAL E MÉTODOS

5 Caracterização físico-química da Glicerina Bruta Residual do Biodiesel (GBRB)

A glicerina bruta residual do biodiesel (GBRB) utilizada como substrato fermentescível foi doada pela Empresa Comanche Biocombustíveis, situada em Simões Filho-BA e foi gerada durante a produção de biodiesel de óleo de soja e metanol no processo de transesterificação. De acordo com o fabricante a GBRB cedida contém 82% (m/m) de glicerol, 6,5% (m/m) de Na⁺, 0,09% (m/m) de metanol e menos que 1,0% (m/m) de monoacilglicerídios.

A composição centesimal da GBRB contemplou a determinação do teor de voláteis, cinzas, proteína bruta, lipídeos totais e carboidratos totais. Estas análises, além de fornecer informações nutricionais do substrato alternativo, são importantes para definir a suplementação do meio fermentativo.

Os voláteis foram determinados por secagem a 105°C em estufa com circulação de ar, de acordo com método da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1997). O teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla a 700°C (AOAC, 1997). O valor de proteína bruta foi calculado a partir da determinação de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl usando o fator geral de conversão (6,25) (AOAC, 1997). O de lipídios totais foi obtido pelo método de Bligh-dyer (1959) e por fim, o total de carboidratos foi determinado por diferença entre 100 e o total dos outros componentes em porcentagem.

6 Microrganismos

As cepas *Cupriavidus necator* IPT 026, *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Cupriavidus necator* IPT 028, utilizadas neste trabalho, são oriundas da coleção de culturas do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT - São Paulo). Os microrganismos foram mantidos em meio ágar nutriente composto de 5,0 g.L⁻¹ de peptona de carne, 3,0 g.L⁻¹ de extrato de carne e 1,5 % de Ágar. A fim de verificar possíveis alterações morfológicas das colônias, foram realizados repiques a cada 15 dias e acondicionados sob refrigeração (4°C). Para minimizar baixas

produções pelos sucessivos repiques e diminuir as flutuações de resultados devido a variações nas populações e alterações genéticas, foi realizado o congelamento imediato da linhagem após repique, em ultra-freezer a -80°C . A cultura foi incubada em caldo nutriente (peptona de carne, $5,0\text{ g.L}^{-1}$ e extrato de carne, $3,0\text{ g.L}^{-1}$) a 30°C por 48h, transferida para tubos (1,5 mL), suspensa em um agente crioprotetor estéril (glicerol 20% v/v) e armazenada em ultra-freezer a -80°C (GALINDO; SALCEDO; RAMIREZ, 1994). Cada experimento foi iniciado com a reativação de uma cultura preservada em glicerol.

7 Produção de polihidroxicanoatos (PHAs)

7.1 Seleção de substratos, microrganismo, condições de fermentação e método de extração de PHAs obtidos em agitador orbital.

7.1.1 Utilização de diferentes substratos para a produção de PHAs

Inicialmente, foram realizados experimentos com o microrganismo *Cupriavidus necator* IPT 026 para selecionar o substrato convencional (Glicose, Sacarose ou Glicerol PA), o substrato alternativo (glicerina bruta residual do biodiesel - GBRB ou resíduo líquido de sisal - RLS) e a concentração de substrato no meio de cultura (10 g.L^{-1} , 20 g.L^{-1} e 30 g.L^{-1}) que maximizasse a produção de PHAs.

As produções de PHAs foram realizadas utilizando-se duas pré-culturas e cultura final. Como primeira pré-cultura, foi inoculada 1 alçada ($\sim 10\text{ }\mu\text{L}$) do microrganismo em 50 mL de meio caldo nutriente e incubado em agitador orbital (TE 424, Tecnal, Figura 15) a 30°C e 150 rpm por 24 horas. Para as demais culturas foi utilizada uma fração de 10% (v/v) em relação ao volume de trabalho utilizado.

O meio mineral (Tabela 7) foi utilizado como segunda pré-cultura, incubado em agitador orbital a 30°C e 150 rpm por 24 horas. Como cultura final utilizou-se o meio mineral (Tabela 7) com limitação de nitrogênio, incubado em agitador orbital a 30°C e 180 rpm por 48 horas. A concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (fonte de nitrogênio) na cultura final foi de $2,3\text{ g.L}^{-1}$. Este meio mineral foi elaborado por Ramsay et al., (1990) modificado por Aragão (1996).



Figura 15: Agitador orbital utilizado para a produção de PHAs (A) e Plataforma do agitador orbital utilizado para produção de PHAs (B).

Tabela 7: Composição do meio mineral sem limitação de nutrientes.

Componente	Concentração na solução (g.L ⁻¹) ^a	Volume adicionado (mL.L ⁻¹ de meio)	Concentração no meio (g.L ⁻¹)
Solução 1	Ácido Nitrilotriacético	10	0,19
	Citrato ferroso de amônia	6	0,06
	MgSO ₄ .7H ₂ O	10	0,5
	CaCl ₂ .2H ₂ O	2	0,01
	(NH ₄) ₂ SO ₄	25	5
	Solução de Oligoelementos ^b	1	1 mL.L ⁻¹
	Água destilada ^c		
Solução 2	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	40	8,95
	KH ₂ PO ₄	40	1,5
Solução 3	Substrato ^d		

a concentrações das soluções estoque.

b a composição da solução concentrada de oligoelementos é demonstrada na Tabela 8.

c o volume de água é calculado em função do volume de soluções adicionado ao meio.

d a composição da fonte de carbono depende do estudo realizado.

Tabela 8: Composição da solução concentrada de oligoelementos.

Elemento	Concentração (g.L ⁻¹)
H ₃ BO ₃	0,30
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,20
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,10
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,03
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,03
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,02
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01

Cada uma das soluções concentradas apresentadas na Tabela 7 foram preparadas separadamente e armazenadas como soluções estoque. O pH da solução 1 foi ajustado a 7,0 com NaOH 10% (m/v) ou HCl 10% (v/v). Em seguida, as soluções 1, 2 e 3 foram autoclavadas separadamente durante 15 minutos a 121°C e adicionadas asépticamente para compor o meio final.

Após o período de incubação, a cultura final foi centrifugada (centrífuga HITACHI, modelo CR 22G) utilizando um rotor a 18000 rpm durante 30 min a 5°C. A biomassa foi recolhida e lavada duas vezes com água destilada e transferida para frascos de 50 ml de vidro e colocada em estufa a 80°C para subsequente extração por aquecimento utilizando clorofórmio e hipoclorito de sódio (2:1 v/v) e posterior evaporação do solvente em estufa a 40°C por 24h. A produção de PHAs foi calculada por método gravimétrico para o biopolímero obtido após extração. A produção foi expressa como g.L⁻¹. A porcentagem de acúmulo foi determinada pela relação entre a quantidade de PHAs produzidos e a quantidade de biomassa.

7.1.2 Seleção de cepas de *Cupriavidus necator* quanto à capacidade de produzir PHAs

Após a definição do substrato convencional, do substrato alternativo e a respectiva concentração de substrato no meio fermentativo, realizou-se a seleção do microrganismo que proporcionasse máxima produção de PHAs. Foram utilizadas as cepas *Cupriavidus necator* IPT 026, *Cupriavidus necator* IPT 027 e *Cupriavidus necator* IPT 028. A produção e a extração de PHAs ocorreram da mesma forma que foi descrito no item 7.1.1.

Para o microrganismo selecionado, realizou-se a curva de crescimento, que foi obtida através da transferência asséptica, em triplicata, de uma alçada do microrganismo para 50 mL de meio caldo nutriente. Este foi incubado em agitador orbital a 30 ± 2°C, 150 rpm por 48h. Amostras do meio fermentado foram coletadas a cada 3 horas e analisadas quanto ao crescimento celular. Esta avaliação foi feita através da leitura de absorbância, em comprimento de onda de 620 nm em espectrofotômetro (Perkin Elmer UV / VIS Lambda 35), contra um branco constituído de caldo nutriente; e por contagem em meio Ágar nutriente através da técnica de profundidade (Pour plate). A curva de crescimento foi montada com as médias dos dados de absorbância e contagem total de colônias (UFC.mL⁻¹) em função do tempo.

7.1.3 Efeito das concentrações dos substratos na produção de PHAs e Alginato

Realizou-se um teste para produção concomitante de PHAs e alginato. A produção e a extração de PHAs ocorreram da mesma forma que foi descrito no item 7.1.1. Após centrifugação da cultura final na produção de PHAs, ao sobrenadante, foi adicionado álcool etílico PA na proporção 3:1 e ocorreu a precipitação do alginato após 24 h de agitação em temperatura ambiente. A produção de alginato foi calculada por método gravimétrico após extração. A produção foi expressa como g.L⁻¹.

7.1.4 Efeito do tempo e da temperatura na produção de PHAs

Após a definição do substrato convencional, do substrato alternativo, da concentração de substrato no meio fermentativo e do microrganismo, verificou-se o efeito do tempo de fermentação da cultura final (24h, 48h, 72h e 96h) combinado com a temperatura (30°C, 32,5°C, 35°C e 37,5°C) que maximiza a produção de PHAs. A produção e a extração de PHAs ocorreram da mesma forma que foi descrito no item 7.1.1.

7.1.5 Influência de diferentes métodos na extração de PHAs

Testou-se outros métodos para extração de PHAs com o intuito de maximizar a recuperação de biopolímero das células do microrganismo. Além do método de extração descrito do item 7.1.1, foram utilizados os métodos de secagem de células em estufa a 80°C e, posterior, extração em clorofórmio por 2h a 60° C, secagem em liofilizador seguido de extração em clorofórmio por 2h a 60° C, e submissão das células com clorofórmio em ultrassom por 2h a 30° C.

7.2 Avaliação das concentrações do substrato alternativo selecionado e de nitrogênio limitante na produção de PHAs em agitador orbital

Para avaliar os efeitos das concentrações do substrato alternativo selecionado e de nitrogênio limitante na produção de PHAs, foi realizado um planejamento estatístico DCCR

(Delineamento Composto Central Rotacional) 2^2 com 2 pontos axiais ($\alpha = \pm 1,41$) para cada variável independente e triplicata do ponto central, totalizando 11 experimentos. Os níveis de concentração do substrato alternativo selecionado e de nitrogênio limitante variaram de acordo com o planejamento dos experimentos. Todos os experimentos foram conduzidos em agitador orbital a 180 rpm com meio fermentativo igual ao descrito no item 7.1.1, no tempo, na temperatura, com o microrganismo e o método de extração selecionado.

A Tabela 9 mostra os níveis e valores codificados em parênteses, onde -1 refere-se ao menor nível das variáveis, 0 corresponde ao ponto central e +1 ao maior. Os valores codificados foram calculados de acordo com a seguinte equação (MEYRS; MONTGOMERY, 2002):

$$\text{Valor codificado} = \frac{(\text{valor atual} - (\text{maior nível} + \text{menor nível}) / 2)}{(\text{maior nível} - \text{menor nível}) / 2}. \quad \text{Eq. 1}$$

Os efeitos individuais e interativos das concentrações do substrato alternativo selecionado (X_1) ($10\text{g.L}^{-1} - 20\text{g.L}^{-1}$) e da concentração de nitrogênio limitante (X_2) ($5\text{g.L}^{-1} - 15\text{g.L}^{-1}$) sobre a produção de PHAs (Y_1) e biomassa (Y_2), foram estudados utilizando a MSR (Metodologia de Superfície de Resposta).

As respostas das variáveis dependentes foram analisadas usando o software *Statistica* versão 7 e nível de confiança de 95%. Os níveis das variáveis independentes foram escolhidos com base em testes preliminares.

Modelos matemáticos foram ajustados aos dados experimentais e por meio da ANOVA (Análise de variância) foram testados quanto a sua capacidade preditiva, através do teste de Fischer (F) para regressão. A falta de ajuste dos modelos foi avaliada pelo teste de F da falta de ajuste e pelo coeficiente de determinação (R^2) (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). Todos os testes de ajuste e previsão dos modelos foram realizados ao nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$).

Tabela 9: Matriz do planejamento experimental composta com a variável concentração do substrato alternativo selecionado (X_1) e concentração de nitrogênio limitante (X_2) e seus respectivos níveis em valores reais e codificados.

Ensaio	Substrato Alternativo		Nitrogênio	
	Valor codificado (X_1)	Valor real (g.L^{-1})	Valor codificado (X_1)	Valor real (g.L^{-1})
1	-1	10	-1	5
2	-1	10	1	15
3	1	20	-1	5
4	1	20	1	15
5	-1,41	8	0	10
6	1,41	22	0	10
7	0	15	-1,41	3
8	0	15	1,41	17
9	0	15	0	10
10	0	15	0	10
11	0	15	0	10

A otimização foi feita a partir da determinação do ponto estacionário da superfície de resposta (X_s), seguindo a equação:

$$X_s = -0,5B^{-1}b \quad \text{Eq. 2}$$

Onde, B é a matriz simétrica ($k \times k$), sendo que na diagonal têm-se os coeficientes da regressão de segunda ordem, e fora da diagonal os coeficientes de interação; e b um vetor ($k \times 1$) composto pelos coeficientes de regressão de primeira ordem.

O valor predito da variável resposta no ponto ótimo é dado pela seguinte equação:

$$\hat{Y}_s = \beta_0 + 0,5X_s b \quad \text{Eq.3}$$

Onde, β_0 é o coeficiente do modelo matemático.

O estudo da natureza da superfície foi realizado a partir da função resposta na forma canônica, dada pela seguinte equação:

$$\hat{Y} = \hat{Y}_s + \lambda_1 W_1^2 + \lambda_2 W_2^2 \quad \text{Eq. 4}$$

Onde, W são as variáveis independentes transformadas; λ são constantes (autovalores ou raízes da matriz B) e \hat{Y}_s resposta estimada no ponto ótimo.

7.3 Avaliação da taxa de aeração e da velocidade de agitação na produção de PHAs em biorreator

Para avaliar os efeitos das taxas de aeração (vvm) e velocidades de agitação (rpm) na produção de PHAs, foi realizado um planejamento estatístico DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) 2^2 com 2 pontos axiais ($\alpha = \pm 1,41$) para cada variável independente e triplicata do ponto central, totalizando 11 experimentos. Os níveis de taxa de aeração e de velocidade de agitação variaram de acordo com o planejamento dos experimentos. Todos os ensaios foram conduzidos em biorreator de bancada Tecnal (Mod. TecBio) com capacidade para 4,5 L e volume útil de 3,0 L (Figura 16) com meio fermentativo igual ao descrito no item 7.1.1, com concentração de substrato alternativo, nitrogênio limitante, microrganismo, tempo, temperatura e método de extração selecionado.



Figura 16: Biorreator Tecnal-TecBio de 4,5 L utilizado para produção de PHAs.

A Tabela 10 mostra os níveis e valores codificados em parênteses, onde -1 refere-se ao menor nível das variáveis, 0 corresponde ao ponto central e +1 ao maior. Os valores codificados foram de acordo com o item 4.2.2.1.

Os efeitos individuais e interativos da taxa de aeração (X_1) (0,5 vvm – 1,5 vvm) e da velocidade de agitação (X_2) (250 rpm – 75- rpm) sobre a produção de PHAs (Y_1) e biomassa a (Y_2), foram estudados utilizando a MSR (Metodologia de Superfície de Resposta).

As respostas das variáveis dependentes foram analisadas e a otimização foi realizada de acordo com o item 7.2.

Tabela 10: Matriz do planejamento experimental composta com a variável taxa de aeração (X_1) e velocidade de agitação (X_2) e seus respectivos níveis em valores reais e codificados.

Ensaio	Taxa de aeração (vvm)		Velocidade de agitação (rpm)	
	Valor codificado (X_1)	Valor real (g.L^{-1})	Valor codificado (X_1)	Valor real (g.L^{-1})
1	-1	0,5	-1	250
2	-1	0,5	1	750
3	1	1,5	-1	250
4	1	1,5	1	750
5	-1,41	0,3	0	500
6	1,41	1,7	0	500
7	0	1	-1,41	146
8	0	1	1,41	854
9	0	1	0	500
10	0	1	0	500
11	0	1	0	500

7.4 Cinética do processo fermentativo

O acompanhamento da cinética do processo fermentativo foi realizado nas condições referentes ao ponto estatisticamente selecionado em função da maior produção de PHAs, ponto ótimo a partir do planejamento estatístico, onde verificou a influência da taxa de aeração e da velocidade de agitação na produção do biopolímero em biorreator. Foram coletadas amostras a cada 12 horas e quantificados as concentrações, em g.L^{-1} , de PHAs, biomassa e GBRB consumida.

A quantificação de PHAs e biomassa seca foram realizadas conforme descrito no item 7.1.1. O consumo de GBRB ao longo da fermentação foi mensurado por cromatografia de exclusão do tamanho molecular em sistema GPC – CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Utilizou-se um cromatografo (Perkin Elmer, serie 200, Shelton, EUA) com colunas Shodex OHpak SB 803, 804, 805, 806 (Kawasaki-Ku, Japan) dispostas em série, usando NaNO_3 (0,05M) como eluente a uma taxa de 1 mL.min^{-1} . O detector usado foi índice de refração (IR) Perkin Elmer serie 200 (Shelton, EUA). A concentração de GBRB foi quantificada através da curva de calibração construída a partir de soluções aquosa de GBRB (máxima de 22 g.L^{-1}) *versus* área dos respectivos picos.

Foram realizados os cálculos dos seguintes parâmetros cinéticos até 96h de fermentação:

- Velocidade instantânea de formação de biomassa ($\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$): $r_x = dX/dt = (X_f - X_i)/(t_f - t_i)$
- Velocidade instantânea de formação de produto ($\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$): $r_p = dP/dt = (P_f - P_i)/(t_f - t_i)$
- Velocidade instantânea de consumo de substrato ($\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$): $r_s = -dS/dt = (S_f - S_i)/(t_f - t_i)$
- Fator de conversão substrato-biomassa: $Y_{x/s} = (X_f - X_i)/(S_i - S_f)$
- Fator de conversão produto-biomassa: $Y_{x/p} = (X_f - X_i)/(P_f - P_i)$
- Fator de conversão substrato-produto: $Y_{p/s} = (P_f - P_i)/(S_i - S_f)$
- Velocidade específica de formação de biomassa (h^{-1}): $\mu_x = (1/X)(dX/dt)$
- Velocidade específica de formação de produto (h^{-1}): $\mu_p = (1/X)(dP/dt)$
- Velocidade específica de consumo de substrato (h^{-1}): $\mu_s = (1/X)(-dS/dt)$

Onde:

X_i = concentração de biomassa no tempo inicial (t_i)

X_f = concentração de biomassa medida no tempo (t_f)

P_i = concentração de produto formado no tempo inicial (t_i)

P_f = concentração de produto formado medido no tempo (t_f)

S_i = concentração de substrato medido no tempo inicial (t_i)

S_f = concentração de substrato medido no tempo (t_f)

As velocidades específicas (μ) foram calculadas através do método geométrico proposto por Le Duy e Zajic (1973).

8 Propriedades dos PHAs obtidos nos diferentes experimentos

As propriedades dos biopolímeros obtidos nos diferentes experimentos foram determinadas através das técnicas de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Análise Termogravimétrica (TGA), Difração de raio-X (DRX), determinação da massa molar por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), e da composição monomérica por Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas (GC-MS).

8.1 Infra-Vermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Amostras de PHAs foram analisadas qualitativamente através de espectroscopia FTIR (PerkinElmer Modelo Espectro 100, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, EUA), num intervalo de 4000 cm^{-1} a 600 cm^{-1} , utilizando acessório de reflectância total atenuada (ATR).

8.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura foi usada para determinar a temperatura de fusão (T_m) das amostras de PHAs, com um equipamento SHIMATZU-50. A temperatura de análise variou de $25\text{ }^\circ\text{C}$ a $200\text{ }^\circ\text{C}$, a uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$.

8.3 Análise termogravimétrica (TG)

As análises termogravimétricas foram realizadas em um analisador térmico Thermogravimetric Analyzer Pyris 1- TGA Perkin Elmer. Os ensaios foram realizados em atmosfera inerte de nitrogênio à $30\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, com taxa de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C}\text{ min}^{-1}$, no intervalo de temperatura de 25 a $600\text{ }^\circ\text{C}$.

8.4 Difração de raio-x (DRX)

A análise foi realizadas em um Difrátômetro de raios-X SHIMADZU (modelo XRD-6000), com passo de $2^\circ/\text{min}$ e radiação de cobre $\lambda = 1,5433\text{ \AA}$, operando com 40 kV e corrente de 30 mA, com varredura entre 5° e 50° . Com os resultados obtidos no difratômetro foi possível calcular os índices de cristalinidade dos PHAs (Equação 5) de acordo com o método empírico de SEGAL et al. (1959), que fornece um valor aproximado de cristalinidade:

$$\text{IC (\%)} = \left[\frac{I_{200} - I_{amf}}{I_{200}} \right] \times 100 \quad \text{Eq. 5}$$

Onde:

IC = Índice de cristalinidade em percentagem;

I_{200} = máxima intensidade do pico de difração que representa o material cristalino na

vizinhança de $2\theta = 220$;

I_{amf} = mínima intensidade do pico de difração que representa o material amorfo na região de $2\theta = 180$.

8.5 Massa molar

Os dados de massa molar foram obtidas por meio de cromatografia GPC-CLAE separado por um Perkin Elmer 200 equipado com um injetor automático, um detector de índice de refração (RI) (Perkin Elmer), uma coluna Shodex 807 KD (30cm x 78 milímetros x 5 mm) e um forno com temperatura de 30°C. Resumidamente, os biopolímeros foram dissolvidos em clorofórmio à uma concentração final de 0,7 mg/mL e a solução de biopolímero resultante foi filtrado (membrana de PTFE, 0,22) antes da análise. A fase móvel foi clorofórmio à um fluxo de 1 mL/min. Uma curva padrão foi constituída usando padrões de poliestireno com intervalo de 682 a 1.670.000 g/mol e baixa polidispersões (Poliestireno de Alto Mw Normas Kit, Polymer Standards Service, EUA). A massa molar dos biopolímeros foram calculados em relação a esses padrões de curva padrão $\log \text{Massa molar} = -0.504 \text{ XTR} + 16,45$, com $R^2 = 0,985$.

8.6 Composição monomérica dos PHAs

A composição monomérica dos PHAs foi determinada utilizando um cromatógrafo gasoso com detector de Espectrometria de Massas (GC-MS PerkinElmer Clarus 500) com o software de versão 4.5.0 e TurboMass biblioteca NIST 98. Aproximadamente 0,04 g de amostra dos PHAs secos produzidos foi submetido a metanólise, com base no método de Braunegg et al. (1978), com as modificações propostas pelo Brandl et al. (1988). A fase orgânica foi separada depois da injeção de splitless com uma coluna capilar DB-1 (30 mx 0,25 x 0,25 milímetros). Hélio (1,0 mL/min) foi utilizado como gás de arraste. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 e 240 ° C, respectivamente. O espectrómetro de massa foi programado para digitalizar no intervalo de 50 a 550 m/z. O seguinte programa de temperatura foi aplicado: 80 ° C a 200 ° C (20°C/min). Os monômeros de PHAs foram identificados por comparação com o tempo de retenção padrão e os espectros de massas.

CAPÍTULO III

RESULTADOS E DISCUSSÃO

9 Caracterização físico-química da Glicerina Bruta Residual do Biodiesel (GBRB)

Com o aumento da quantidade de biodiesel produzido no mundo, o volume de glicerina também é gerado em grandes quantidades, tornando-se essencial que novas possibilidades de destinação deste resíduo sejam encontradas para auxiliar a cadeia produtiva de biodiesel e fazer os custos de produção do biocombustível serem competitivos com produtos petrolíferos. É bem conhecido que a glicerina pode ser utilizada por diversos microrganismos como substrato para o desenvolvimento de bioprodutos (ZHU et al., 2010; TEODORO et al., 2010; ÇELIK et al., 2008; REIS et al., 2010). No entanto, até recentemente, pouco trabalho foi realizado para utilizar a GBRB como substrato para produção biológica de produtos de valor agregado com potenciais usos industriais (ASHBY et al., 2011). Portanto, é necessário conhecer a composição físico-química da GBRB para utilização como substrato fermentescível a fim de obter produtos biotecnológicos.

Os valores da composição química da GBRB estão expostos na Tabela 11, mostrando que contém minerais, nitrogênio orgânico e lipídios oriundos do processamento do biodiesel. Como a concentração de glicerina residual foi utilizada a 20% no meio fermentativo, a quantidade da fração de carbono contida no meio (33,69% de carboidratos e 6,07% de lipídios) corresponde aproximadamente a 8g e, junto aos demais nutrientes adicionados ao meio fermentativo, atendem às necessidades nutricionais da bactéria durante o processo fermentativo, de forma a induzir a reprodução celular e o acúmulo intracelular de polímero.

Tabela 11: Composição química da glicerina bruta residual do biodiesel utilizada na etapa de fermentação para obtenção de PHAs.

Parâmetros	Composição (%)
Umidade	53,50 ± 0,01
Cinzas	3,40 ± 0,01
Lipídios totais	6,70 ± 0,02
Proteína bruta	2,71 ± 0,03
Carboidratos	33,69 ± 0,02

Thompson e He (2006), afirmam que a glicerina residual do biodiesel é rica em carbono e macro e micronutrientes prontamente biodisponíveis, tais como o cálcio (3-15 ppm), magnésio (1-2 ppm), fósforo (8-13 ppm) e enxofre (22 - 26 ppm), que independente da fontes de matéria prima utilizada para produção de biodiesel (canola, milho e soja). Isso demonstra o potencial de aplicação da GBRB como substrato fermentescível na produção de PHAs, agregando valor a este co-produto da indústria do biodiesel e possibilitando a redução dos custos de produção do polímero.

10 Produção de polihidroxialcanoatos

10.1 Seleção de substratos, microrganismo, condições de fermentação e método de extração de PHAs obtidos em agitador orbital.

10.1.1 Utilização de diferentes substratos (Glicose, Sacarose, Glicerol PA, Resíduo líquido de sisal - RLS e Glicerina bruta residual do biodiesel – GBRB) para a produção de PHAs

Foram realizados experimentos preliminares em agitador orbital (180 rpm, 30° C, 48h) utilizando a cepa *Cupriavidus necator* IPT 026 para verificar a possibilidade de produção de células (biomassa) e de PHAs a partir de diferentes substratos. Foram utilizados como substratos alternativos, o resíduo líquido de sisal – RLS e a glicerina bruta residual do biodiesel – GBRB, e como substratos convencionais, a glicose, a sacarose e o glicerol PA. Os diferentes substratos foram adicionados ao meio fermentativo em diferentes concentrações a fim de selecionar um substrato convencional e um alternativo, além de determinar a melhor concentração destes substratos no meio fermentativo em função da maior produção de PHAs. Os resultados estão apresentados na Tabela 12.

Pode-se observar na Tabela 12 que o melhor resultado de produção de biomassa e de PHAs para o substrato convencional foi obtido utilizando a glicose na concentração de 20 g.L⁻¹. Este valor também é relatado por diversos autores (SQUIO e ARAGÃO, 2004; FACCIN et al, 2009) que também consideram a glicose como meio padrão para produção de PHAs. Com relação ao substrato alternativo, o melhor resultado foi obtido utilizando a GBRB na concentração de 20 g.L⁻¹ com produção de 0,45 g.L⁻¹ do biopolímero e acúmulo de 10,6%.

Ibrahim e Steinbuchel (2009b), utilizaram glicerina do biodiesel na concentração de 20 g.L⁻¹ para produção de PHAs em agitador orbital (200 rpm, 41°C, 96h) com microrganismo *Zobellella denitrificans* e obtiveram 2,82 g.L⁻¹ de PHAs, com 80,1% de acúmulo de biopolímero nas células da bactéria. Os baixos valores de produção e de acúmulo de PHAs obtidos neste experimento podem ser atribuídos às condições de obtenção do biopolímero não serem ainda às otimizadas.

Tabela 12: Produções de biomassa e de PHAs a partir de diferentes concentrações e diferentes substratos em agitador orbital (180 rpm, 30°C, 48h) por *Cupriavidus necator* IPT 026.

Substrato	Concentração de substrato (g.L ⁻¹)	Biomassa (g.L ⁻¹)	PHA (g.L ⁻¹)	Acúmulo (%)
Glicose	10	2,13	0,18	8,4
	20	2,98	0,26	8,7
	30	2,15	0,13	6,0
Sacarose	10	1,96	0,09	4,6
	20	2,39	0,18	7,5
	30	1,82	0,15	8,2
RLS	10	0,67	0,05	7,4
	20	0,49	0,03	6,1
	30	0,32	0,01	3,1
Glicerol PA	10	1,37	0,12	8,7
	20	1,76	0,19	10,8
	30	2,34	0,15	6,4
GBRB	10	3,45	0,32	9,3
	20	4,22	0,45	10,6
	30	3,12	0,21	6,7

A maior produção de biomassa e de PHAs utilizando a GBRB em relação à glicose, pode ser explicada pelo resíduo apresentar em sua composição, nutrientes que auxiliam o microrganismo a se multiplicar e acumular biopolímero dentro das células. Existem relatos de outras concentrações de glicerina bruta do biodiesel utilizadas para obtenção do biopolímero. Naranjo et al. (2013) utilizaram 50 g.L⁻¹ e produziram 3,4 g.L⁻¹ com 59,6% de acúmulo, Ashby et al. (2011) utilizaram 2% (v/v) e produziram 1,14 g.L⁻¹ de PHAs com 38,0% de acúmulo. Diversos substratos alternativos também já foram utilizados em agitador orbital na tentativa de diminuir os custos de produção do bioplástico: com soro de leite e a cepa

Haloferax mediterranei DSM 1411 obteve-se 12,2 g.L⁻¹ de PHAs (KOLLER et al., 2008); amido de arroz e *Cupriavidus necator* DSM 545 resultou em 5 g.L⁻¹ de PHAs (DALCANTON et al., 2010), e com glicerol purificado e *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 foi produzido 6 g.L⁻¹ de PHAs (ZHU et al, 2010). Portanto, a GBRB pode ser utilizada como substrato alternativo em variadas concentrações para a produção de PHAs.

10.1.2 Seleção de cepa de *Cupriavidus necator* quanto à capacidade de produzir PHAs (screening)

Após a seleção dos substratos, o convencional e o alternativo, e da concentração a ser utilizada no meio fermentativo durante o estudo, foram realizados testes em agitador orbital (180 rpm, 30° C, 48h) para verificar a possibilidade de produção de células (biomassa) e PHAs a partir de diferentes microrganismos utilizando a glicose e a GBRB como substratos na concentração de 20g.L⁻¹, a fim de selecionar um microrganismo a ser utilizado durante todo o estudo, considerando que a seleção do microrganismo e do substrato têm grande influência no custo de produção de PHAs (ANDERSON e DAWES, 1990). A seleção deve ser baseada em habilidades como: capacidade do microrganismo em utilizar substratos baratos, velocidade de crescimento, velocidade de síntese do polímero, percentual de acúmulo do polímero, sendo que os três últimos itens afetam diretamente a produtividade, que deve ser elevada. Os valores de biomassa e de PHAs obtidos estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Produções de biomassa e de PHAs a partir de glicose e GBRB por diferentes microrganismos em agitador orbital (180 rpm, 30° C, 48h).

Cepas	Glicose (20g.L ⁻¹)		GBRB (20g.L ⁻¹)	
	Biomassa (g.L ⁻¹)	PHA (g.L ⁻¹)	Biomassa (g.L ⁻¹)	PHA (g.L ⁻¹)
IPT 026 – <i>Cupriavidus necator</i>	2,91	0,22	4,39	0,49
IPT 027 – <i>Cupriavidus necator</i>	2,13	0,10	3,48	0,32
IPT 028 – <i>Cupriavidus necator</i>	1,67	0,04	2,13	0,11

De acordo com a Tabela 13, os maiores valores de biomassa e de PHAs para os dois substratos testados foram obtidos com *Cupriavidus necator* IPT 026. Provavelmente, esse microrganismo em comparação com os outros, encontrou melhores condições de adaptação para multiplicação e acúmulo no meio fermentativo. Delgado (2006) utilizou diversos

microrganismos e também encontrou os melhores resultados para esta cepa por fermentação de óleo de soja, obtendo 80 g.L^{-1} de PHAs em sistema de batelada alimentada. Isto pode indicar uma importante contribuição dos 6,70% correspondentes à fração lipídica total da GBRB (Tabela 11) para a biossíntese de PHAs, uma vez que ao utilizar 20 g.L^{-1} deste substrato no meio fermentativo, $1,34 \text{ g.L}^{-1}$ são mono-, di- ou tri-glicerídeos ou ácidos graxos livres oriundos do processo de produção de biodiesel, além de glicerol disponível para a reprodução e manutenção celular e acúmulo do polímero.

Não existem relatos na literatura sobre a produção de PHAs com esta cepa utilizando a GBRB como substrato. Com o mesmo substrato, MOTHE et al. (2007), utilizando a cepa *Cupriavidus necator* JMP 134 obteve $4,46 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa e $3,12 \text{ g.L}^{-1}$ de PHAs, e CAVALHEIRO et al. (2009), com a cepa *Cupriavidus necator* DSM 545 obteve $13,5 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa e $4,2 \text{ g.L}^{-1}$ de PHAs, o que mostra a importância da seleção do microrganismo na produção do biopolímero.

A curva de crescimento do microrganismo *Cupriavidus necator* IPT 026 (Figura 17) foi construída a fim de se obter informações da fase exponencial da bactéria, através da variação da concentração celular ao longo do processo. O conhecimento a cerca desse estudo permite maior reprodutibilidade dos experimentos, uma vez que os inóculos contem a mesma faixa de concentração celular. A fase de crescimento celular é composta basicamente por duas fases: lag e log. A fase lag, de adaptação interna da célula ao novo meio de cultura, corresponde à indução das enzimas necessárias para metabolizar os nutrientes. A síntese de RNA é iniciada logo no início do contato da célula com o novo meio e posteriormente ocorre a síntese de proteínas. Em seguida, são iniciadas as sínteses de polissacarídeos e de fosfolipídeos, que permitirão aumentar o volume celular e a massa da célula. A síntese de DNA ocorre somente no final da fase lag. A partir da análise da Figura 17, observa-se que o microrganismo apresenta fase lag compreendida entre as doze primeiras horas de incubação. Isso indica que as condições de processo favorecem à rápida adaptação do microrganismo ao meio de cultura. A partir de 12 horas, iniciou-se a fase de crescimento exponencial, cujo ápice ocorre em 24 horas de incubação. A partir de então, inicia-se a fase estacionária de crescimento celular, na qual a concentração atinge o valor máximo e se mantém praticamente constante. Como as concentrações celulares entre 24 e 42 horas são similares, adotou-se 24 horas de incubação como tempo ideal para obtenção de máxima concentração celular do

inóculo, a ser transferido para o meio fermentativo contendo GBRB. Neste período a concentração celular foi em média 1×10^{12} UFC.mL⁻¹.

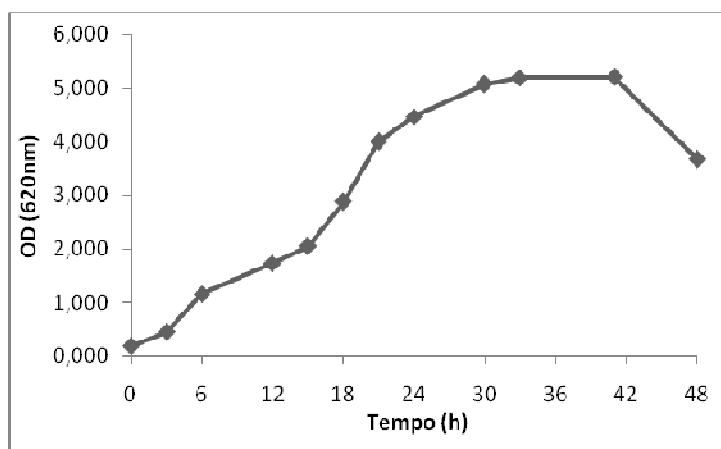


Figura 17: Curva de crescimento (620 nm) do inóculo para *Cupriavidus necator* IPT 026 incubado a 30°C e 150 rpm.

Este tempo de produção de inóculo (24h), também foi utilizado por diversos autores que trabalham com este microrganismo (DELGADO, 2006; TAVARES et al., 2004; SANCHEZ et al. 2003).

10.1.3 Efeito das concentrações de GBRB e glicose na produção de PHAs e Alginato em agitador orbital

Algumas bactérias, além de produzirem PHAs, podem sob determinadas condições de limitação de micro e macronutrientes e excesso da fonte de carbono, produzir o alginato que é um polissacarídeo com uma diversidade de aplicações nos setores alimentício e farmacêutico. Numa fermentação submersa, a parte sólida produzida representa a massa celular (biomassa) onde os PHAs que são intracelulares estão contidos, enquanto a parte líquida (sobrenadante) contém o alginato. Tendo em vista a importância mundial do alginato e dos PHAs, foram realizados testes em agitador orbital (180 rpm, 30° C, 48h) para produção concomitante de alginato e PHAs a partir de diferentes concentrações de GBRB e glicose, utilizando o microrganismo *Cupriavidus necator* IPT 026. Os resultados da produção de PHAs e alginato estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Produções de PHAs e alginato, e rendimento de extração de PHAs a partir da fermentação de diferentes concentrações e glicose e GBRB em agitador orbital em agitador orbital (180 rpm, 30° C, 48h).

Produto	Concentração de substrato	10 g.L ⁻¹	20 g.L ⁻¹	30 g.L ⁻¹	
PHA	Glicose	Biomassa (g.L ⁻¹)	2,25	2,79	2,14
		PHA (g.L ⁻¹)	0,20	0,25	0,12
		Rendimento de extração (%)	8,9	8,9	5,6
	GBRB	Biomassa (g.L ⁻¹)	3,62	4,59	3,21
		PHA (g.L ⁻¹)	0,36	0,47	0,21
		Rendimento de extração (%)	9,9	10,2	6,5
Alginato	Glicose	Produção (g.L ⁻¹)	1,43	0,87	1,60
	GBRB	Produção (g.L ⁻¹)	2,42	1,04	2,83

Pode-se observar na Tabela 14 que a maior produção de PHAs a partir da fermentação da glicose e de GBRB ocorreram na concentração de 20 g.L⁻¹, e nesta concentração ocorreu menor produção de alginato. Na concentração de 30 g.L⁻¹ ocorreu a menor produção de PHAs para os dois substratos, enquanto que a maior produção de alginato aconteceu nesta concentração. Isto indica que *Cupriavidus necator* IPT 026 pode ser utilizado para produzir PHAs e alginato concomitantemente, e que o microrganismo utiliza diferentes rotas metabólicas, que provavelmente são concorrentes, para a produção dos bioprodutos, favorecendo uma em relação à outra de acordo com a concentração do substrato. Silva e Garcia-Cruz (2010) conseguiram aumentar a produção de alginato em 50% com o aumento da concentração de glicose em 20%, e concluíram que uma menor concentração de glicose favorece a produção de PHAs.

10.1.4 Efeito do tempo e da temperatura na produção de PHAs a partir da fermentação de GBRB e Glicose em agitador orbital

Foi avaliada a produção de biomassa e de PHAs em em agitador orbital (180 rpm) utilizando diferentes temperaturas (30°C, 32,5°C, 35°C e 37,5°C) e tempos de fermentação (24h, 48h, 72h e 96h) por fermentação da glicose (20 g.L⁻¹) e da GBRB (20 g.L⁻¹) com a cepa *Cupriavidus necator* IPT 026. Os resultados estão apresentados na Tabela 15.

O estudo da temperatura de cultivo de *Cupriavidus necator* para produção de PHAs é um parâmetro importante, pois a possibilidade de operação em temperaturas mais altas que a utilizada (30°C) em níveis industriais é interessante em virtude da economia em algumas etapas de troca de calor (DALCANTON, 2006). A influência do tempo de fermentação também é um parâmetro indispensável, pois poderá contribuir para um maior acúmulo de polímero nas células do microrganismo em menor tempo.

Pode-se observar na Tabela 15, para os dois substratos utilizados o aumento da temperatura até 35°C é favorável às produções de biomassa e de PHAs, após esta temperatura ocorre uma diminuição na quantidade de biomassa e PHAs produzidos. Este fato pode ser explicado, levando-se em consideração que em temperaturas mais elevadas, o microrganismo pode não se adaptar totalmente às condições de multiplicação celular e acúmulo de PHAs nas células. Em relação ao tempo de fermentação, ocorre um aumento das produções de biomassa e de PHAs até 72h, após este tempo diminui o teor de PHAs acumulado nas células. Provavelmente, após 72h, ocorre a falta de substrato no meio fermentativo, provocando a morte de parte das células do microrganismo, fazendo com que este microrganismo utilize o biopolímero produzido como fonte de energia.

O aumento da temperatura de 30° C para 35° C e do tempo de fermentação de 24h para 72h quando se utilizou GBRB resultou num aumento de até 700% na produção de PHAs, mostrando uma melhor adaptação do microrganismo na temperatura de 35°C em 72h de fermentação. Provavelmente, ocorreu maior acúmulo de PHAs sem degradação e consumo da fonte de reserva durante a fermentação.

A quantidade de PHAs acumulados no interior das células do microrganismo, foi maior com o aumento do tempo e da temperatura de fermentação, mostrando que na etapa de limitação de nitrogênio ocorreu maior acúmulo, ou seja, o aumento do tempo e da temperatura favoreceu o acúmulo de PHAs nas células.

A literatura cita temperaturas ótimas de crescimento entre 30 - 34°C (MARANGONI, 2000; GROTHE et al., 1999), e a maioria dos estudos são realizados a 30°C. Contudo, de acordo com um estudo comparativo para síntese celular e produção de polímero a partir da glicose (30 g.L⁻¹) em agitador orbital, desenvolvido por FIORESE (2008), 35°C é a temperatura que favorece o crescimento de *Cupriavidus necator*. Kawata e Alba (2010), utilizando *Halomonas sp* para produzir PHAs a partir de glicerina residual do biodiesel em

agitador orbital (150 rpm) a 30°C por 60h, obteve 1,6 g.L⁻¹ de biopolímero. Mothes et al. (2007), utilizaram *Cupriavidus necator* a 35°C por 50h, e obtiveram 3,12g.L⁻¹ de PHAs.

Tabela 15: Produções de biomassa e de PHAs em função do tempo de fermentação e da temperatura em agitador orbital (180 rpm, 30° C, 48h) por *Cupriavidus necator* IPT 026.

Temperatura (°C)	Tempo de fermentação	24 h	48 h	72 h	96h		
30,0	Glicose	Biomassa (g.L ⁻¹)	1,34	2,89	2,91	2,20	
		PHA (g.L ⁻¹)	0,11	0,35	1,23	0,42	
		Rendimento de extração (%)	8,2	12,1	42,2	19,1	
	GBRB	Biomassa (g.L ⁻¹)	2,63	4,43	4,45	3,21	
		PHA (g.L ⁻¹)	0,21	0,55	0,90	0,32	
		Rendimento de extração (%)	8,0	13,7	33,0	9,9	
	32,5	Glicose	Biomassa (g.L ⁻¹)	1,85	2,37	2,64	1,99
			PHA (g.L ⁻¹)	0,50	0,51	1,13	0,72
			Rendimento de extração (%)	27,0	21,5	42,8	36,2
GBRB		Biomassa (g.L ⁻¹)	2,74	4,48	4,58	3,52	
		PHA (g.L ⁻¹)	0,29	0,59	1,03	0,39	
		Rendimento de extração (%)	10,5	13,2	22,5	11,1	
35,0		Glicose	Biomassa (g.L ⁻¹)	1,90	2,98	2,42	2,12
			PHA (g.L ⁻¹)	0,54	0,68	0,90	0,52
			Rendimento de extração (%)	28,4	22,8	37,2	24,5
	GBRB	Biomassa (g.L ⁻¹)	2,92	4,52	4,63	3,78	
		PHA (g.L ⁻¹)	0,62	1,16	1,82	0,98	
		Rendimento de extração (%)	21,2	25,7	39,3	25,9	
	37,5	Glicose	Biomassa (g.L ⁻¹)	1,22	1,82	1,44	1,10
			PHA (g.L ⁻¹)	0,24	0,28	0,78	0,09
			Rendimento de extração (%)	19,7	15,4	54,2	8,2
GBRB		Biomassa (g.L ⁻¹)	1,82	3,26	3,53	3,65	
		PHA (g.L ⁻¹)	0,42	0,76	0,92	0,82	
		Rendimento de extração (%)	23,0	23,3	26,1	22,5	

Os PHAs obtidos em todos os experimentos preliminares, foram extraídos das células do microrganismo utilizando um método de extração por aquecimento com solubilização em clorofórmio e hipoclorito de sódio e posterior evaporação do solvente em estufa a 40° C por 24 h. Porém, esse método resultou baixo rendimento de extração do polímero, apesar do aumento da produção observado após as seleções do microrganismo e dos parâmetros de tempo e temperatura de fermentação em agitador orbital, este não foi proporcional ao

aumento dos valores de produção de biomassa (Tabela 15). Isto demonstra que, provavelmente, a extração de PHAs realizada não foi eficaz para a obtenção do polímero por lise celular.

10.1.5 Influência de diferentes métodos na extração de PHAs produzidos a partir de GBRB em agitador orbital (180 rpm, 30° C, 48h) por *Cupriavidus necator* IPT 026.

Foram testadas 3 possibilidades: (A) secagem das células em estufa a 80°C e, posterior, extração com clorofórmio (1:50 m/v) por 2h a 60° C com agitação vigorosa; (B) secagem de células em liofilizador seguida de extração em clorofórmio (1:50 m/v) por 2h a 60° C com agitação vigorosa, filtragem e evaporação do solvente; e (C) submissão das células e clorofórmio (1:50 m/v) em ultra-som por 2h a 30° C. Os resultados de rendimentos dos métodos de extrações utilizadas estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16: Rendimentos de extrações de PHAs a partir de diferentes métodos.

Método de extração	Rendimento da extração (%)
A	46,61
B	54,63
C	20,02
D	14,21

(A) secagem das células em estufa a 80° C e posterior extração em clorofórmio por 2h a 60° C; (B) secagem em liofilizador e posterior extração em clorofórmio por 2h a 60° C; (C) colocação das células com clorofórmio em ultra-som por 2h a 30° C; (D) secagem em estufa e posterior extração em clorofórmio e hipoclorito de sódio.

O método de extração que emprega liofilização das células e utilização do clorofórmio para solubilização do polímero apresentou, em relação ao método de extração com clorofórmio e hipoclorito, um aumento de 228% no rendimento de extração, o que possibilitou aumentar a quantidade de polímero retirado das células de microrganismos. O método de liofilização combinado com a utilização de clorofórmio é utilizado por diversos autores, tais como Koller et al. (2008), Panidan et al. (2010) e Ashby et al. (2011). Devido a este método ser mais eficiente na extração do biopolímero, foi utilizado no decorrer do estudo. A solução de clorofórmio e biopolímero solubilizado são colocados em estufa para evaporação do solvente e por consequência formam um filme na superfície da placa de vidro (Figura 18).



Figura 18: Filme de PHA obtido após evaporação do solvente.

10.1.6 Conclusões parciais

A GBRB é um substrato rico em nutrientes e pode ser utilizado na produção de PHAs, possibilitando a agregação de valor a este co-produto da indústria do biodiesel aliada a redução dos custos de produção do polímero.

A seleção de cepas, assim como, a escolha do substrato são fatores determinantes para a produção de PHAs. O substrato alternativo GBRB a 20 g.L^{-1} em agitador orbital (35°C , 72h) foi melhor utilizado pelo microrganismo *Cupriavidus necator* IPT 026 para a produção de PHAs, resultando em maiores valores de produção, em relação ao substrato convencional (glicose).

Diferentes métodos de extração de PHAs das células do microrganismo foram testados e o que mais recuperou o biopolímero das células de *Cupriavidus necator* IPT 026 foi o método que consistiu em liofilizar as células, seguido de agitação por 2h em clorofórmio (1:50 m/v) e dispersão do material filtrado em placa, seguido de secagem em estufa por 24h.

É necessário estudar outros parâmetros da produção de PHAs a partir da GBRB e *Cupriavidus necator* IPT 026 em agitador orbital, com o intuito de aumentar simultaneamente as quantidades de células e de biopolímero.

11 Influência das concentrações de GBRB e de nitrogênio na produção de PHAs por *Cupriavidus necator* IPT 026 em agitador orbital usando metodologia de superfície de resposta e suas propriedades

Foi realizado um planejamento estatístico DCCR para avaliar os efeitos das concentrações de GBRB e do nitrogênio limitante na produção de biomassa e de PHAs. Os

níveis de concentração de GBRB e de nitrogênio limitante variaram de acordo com o planejamento de experimentos. Todos os experimentos foram conduzidos em agitador orbital, a 35°C, 72 horas e 180 rpm, pH 7,0, utilizando a cepa *Cupriavidus necator* IPT 026.

A Tabela 17 mostra os valores das variáveis independentes codificadas e não codificada de acordo com o planejamento experimental e as respostas (produção de PHAs, Y_1 , e produção de biomassa, Y_2) para todas os experimentos. Cada linha representa um experimentos realizado em agitador orbital. Os experimentos foram randomizados para minimizar os efeitos de variáveis inexplicadas nas respostas observadas devido a fatores externos. A apresentação ordenada na Tabela 17 foi utilizada para facilitar a visualização.

Tabela 17: Planejamento experimental (condições e respostas) para as produções de PHAs e biomassa em agitador orbital (35° C, 72 h, 180 rpm) por *Cupriavidus necator* IPT 026.

Experimento	GBRB		Nitrogênio		C:N	Produção de PHAs Y_1 (g.L ⁻¹)	Produção de Biomassa Y_2 (g..L ⁻¹)	Extração (%)
	Valor codificado	Valor real	Valor codificado	Valor real				
	(X_1)	(g.L ⁻¹)	(X_2)	(g.L ⁻¹)				
1	-1	10	-1	5	0,75	0,11	0,15	73,33
2	-1	10	1	15	0,25	1,23	1,57	78,34
3	1	20	-1	5	1,50	0,41	0,65	63,08
4	1	20	1	15	0,50	1,56	2,16	72,22
5	-1,41	8	0	10	0,30	0,82	1,34	61,19
6	1,41	22	0	10	0,80	1,12	1,59	70,44
7	0	15	-1,41	3	1,80	0,29	0,45	64,44
8	0	15	1,41	17	0,35	1,39	2,27	61,23
9	0	15	0	10	0,60	2,81	4,34	64,75
10	0	15	0	10	0,60	2,73	4,17	65,47
11	0	15	0	10	0,60	2,66	4,29	62,00

11.1 Tratamento das respostas dos experimentos

A análise estatística para o tratamento dos dados das respostas da Tabela 17 foi realizada a um nível de significância de 95%. A Tabela 18 apresenta a estimativa dos coeficientes de regressão (utilizando valores codificados). Quando o modelo de regressão é

determinado com valores codificados das variáveis, o valor de cada coeficiente mostra diretamente a importância de cada efeito nas respostas do planejamento experimental.

Os coeficientes de determinação (R^2), indicam o valor percentual explicado na respostas a partir do modelo de regressão. Como mostrado na Tabela 18, que lista os coeficientes de determinação do modelo, a produção de PHAs e a produção de biomassa, foram explicadas em 99,0 % e 98,9 %, respectivamente.

Os valores t que são zero, correspondem à hipótese nula. Um valor de $p < 0,05$ sugere menos de 5% de probabilidade de que a hipótese nula é verdadeiro (isto é, rejeita a hipótese nula). A interação entre as concentrações de GBRB e de nitrogênio limitante não é significativa para a produção de PHAs. Para a produção de biomassa, a concentração de GBRB linear e a interação entre as concentrações de GBRB e de nitrogênio também são insignificantes.

Tabela 18: Coeficientes estimados de determinação múltipla para produção de PHAs (A) e de biomassa (B) utilizando valores codificados.

Termo	Coefficiente	SE Coeficiente	t	p
(A) Produção de PHAs [$S = 0,018472/R^2 = 0,990/R^2(\text{adj}) = 0,980$]				
Média/Interação	2,7333	0,078469	34,833	0,000
GBRB	0,1318	0,048052	2,743	0,041
GBRB x GBRB	-0,9010	0,057193	-15,754	0,000
Nitrogênio	0,4782	0,048052	9,952	0,000
Nitrogênio x Nitrogênio	-0,9660	0,057193	-16,891	0,000
GBRB x Nitrogênio	0,0075	0,067956	0,110	0,916
(B) Produção de Biomassa [$S = 0,0511429/R^2 = 0,989/R^2(\text{adj}) = 0,978$]				
Média/Interação	4,2667	0,130567	32,678	0,000
GBRB	0,1804	0,079955	2,257	0,074
GBRB x GBRB	-1,4708	0,095166	-15,456	0,000
Nitrogênio	0,6880	0,079955	8,604	0,000
Nitrogênio x Nitrogênio	-1,5233	0,095166	-16,007	0,000
GBRB x Nitrogênio	0,0225	0,113074	0,199	0,850

S = Erro padrão; R^2 = coeficiente de determinação; $R^2(\text{adj})$ = coeficiente de determinação ajustado

A análise de variância é mostrada na Tabela 19. Os dados sugerem que o modelo de segunda ordem é apropriado, e os efeitos linear e quadrático são significativos ($p > 0,05$).

Além disso, não há nenhuma evidência da falta de ajuste, porque os valores de p são 0,177 e 0,088 ($> 0,05$) para a produção de PHAs e de biomassa, respectivamente.

Tabela 19: Análise de variância (ANOVA) para a produção de PHAs (A) e biomassa (B) usando valores codificados.

	GL	SS	MS	F	p
(A) Produção de PHAs					
Regressão	5	11,823348	11,823348	2098,8191	0,903669
Erro Residual	5	0,092360	0,032664	4,7984	0,177281
Falta de ajuste	3	0,081093	0,027031	4,7984	
Erro puro	2	0,011267	0,005633		
Total	10	11,915708	11,856012		
(B) Produção de Biomassa					
Regressão	5	29,369897	29,369897	3847,5847	0,689081
Erro Residual	5	0,255715	0,087783	5,4999	0,088203
Falta de ajuste	3	0,240448	0,080149	5,4999	0,088203
Erro puro	2	0,015267	0,007633		
Total	10	29,625611	29,457679		

Estes resultados mostram ainda que, os modelos escolhidos podem explicar satisfatoriamente os efeitos da concentração de GBRB (X_1) e de nitrogênio (X_2) sobre as produções de PHAs e de biomassa. Os modelos que se enquadram nas variáveis da resposta acima são compostos de valores não codificados (valores reais). As equações finais para Y_1 e Y_2 , derivadas da aplicação do método são apresentados nas equações 6 e 7, respectivamente. O conjunto de equações canônicas (\hat{Y}_1 e \hat{Y}_2) são apresentados nas equações 8 e 9. As variáveis W_1 e W_2 representam X_1 e X_2 , respectivamente, em formas canônicas.

Para a produção de PHAs (Y_1):

$$Y_1 = 2,733 + 0,1318 X_1 - 0,9010 X_1^2 + 0,4782 X_2 - 0,9660 X_2^2 + 0,0075 X_1 X_2 \quad (\text{Eq. 6})$$

$$\hat{Y}_1 = 2,895 - 0,5211 W_1^2 - 4,875 W_2^2 \quad (\text{Eq. 8})$$

Para a produção de biomassa (Y_2):

$$Y_2 = 4,2667 + 0,1804 X_1 - 1,4708 X_1^2 + 0,6880 X_2 - 1,5233 X_2^2 + 0,0225 X_1 X_2 \quad (\text{Eq. 7})$$

$$\hat{Y}_2 = 4,279 - 0,237 W_1^2 - 1,147 W_2^2 \quad (\text{Eq. 9})$$

Utilizando-se quaisquer valores para os dois fatores concentrações de (GBRB e nitrogênio) pode-se estimar a quantidade produzida de PHAs e de biomassa. Estas equações têm um significado matemático (derivadas do planejamento estatístico) e não um significado fisiológico (não pode-se estimar a partir de uma quantidade de microrganismo).

Os sinais negativos para as raízes λ_1 (-0,5211 e -4,875) e λ_2 (-0,237 e -1,147), obtidas a partir das equações canônicas (\hat{Y}_1 e \hat{Y}_2) indicam que as respostas Y_1 e Y_2 têm um ponto máximo.

Y_1 (2,763 g.L⁻¹) foi maximizada à uma concentração de GBRB de 14,983 g.L⁻¹, e à uma concentração de nitrogênio de 9,86 g.L⁻¹. Y_2 (4,258 g.L⁻¹) foi maximizada utilizando 15,015 g.L⁻¹ de GBRB e 10,035 g.L⁻¹ de nitrogênio. Este resultado está de acordo com os apresentados na Tabela 17, no qual a produção máxima foi obtida no ponto central (15 g.L⁻¹ e de 10 g.L⁻¹, para GBRB e nitrogênio, respectivamente).

11.2 Influência da concentração de GBRB e de nitrogênio na produção de PHAs (Resposta Y_1)

As magnitudes dos coeficientes da Tabela 18 mostram que a concentração de nitrogênio (linear) tem maior influência na produção de PHAs do que a concentração de GBRB (cerca de quatro vezes). Por outro lado, as concentrações de nitrogênio e de GBRB tem um efeito quadrático negativo (a magnitude do efeito da concentração de GBRB é semelhante ao efeito da concentração de nitrogênio), e a interação entre a concentração de GBRB e nitrogênio tem um efeito positivo, mas tem baixa influência em comparação com os outros efeitos.

A Figura 19 apresenta a superfície de resposta para a produção de PHAs em diferentes concentrações de GBRB e de nitrogênio mostrando os pontos de mínimos e de máximos. A concentração de GBRB afeta significativamente a produção de PHAs. Aumentando os valores

da concentração de GBRB para o ponto central (15 g.L⁻¹), ocorreu um aumento na produção de PHAs. De acordo com Braunegg et al. (1998) e Volova (2004), em condições de crescimento desbalanceado e de limitação de algum nutriente essencial ao crescimento, o piruvato não entra no TCA, mas é descarboxilado, formando acetil-CoA. Assim, o nível de CoA disponível é reduzido, favorecendo a ativação do ciclo de enzimas que sintetizam o biopolímero. De acordo com a Tabela 17, a produção de PHAs foi maximizada a 15 g.L⁻¹ de GBRB e 10 g.L⁻¹ de nitrogênio, com uma relação C: N de 0,6. A produção de PHAs foi mínima (0,11 g.L⁻¹), com 10 g.L⁻¹ de GBRB e 5 g.L⁻¹ de nitrogênio, onde a relação C: N de 0,75, (Tabela 17).

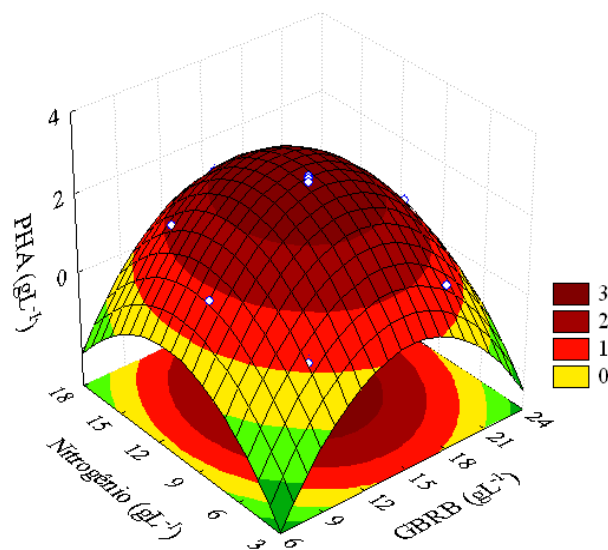


Figura 19: Efeito das concentrações de GBRB de Nitrogênio na produção de PHAs em agitador orbital (35°C/72h/180rpm) por *Cupriavidus necator* IPT 026.

A concentração de nitrogênio também afetou significativamente a produção de PHAs (Figura 19). Concentrações baixa e alta de nitrogênio resultaram em menor produção de PHAs. O nitrogênio é um nutriente importante para o microrganismo durante a produção de PHAs, sendo que este nutriente deve ser limitado para possibilitar acúmulo do polímero intracelularmente (Madison e Huisman, 1999;. Faccin et al, 2009). O nitrogênio desempenha um papel particularmente importante, pois todos os organismos vivos o necessitam para formar as proteínas; por outro lado, o excesso deste elemento pode provocar toxicidade do substrato pela produção de amoníaco (HANSEN et al., 1998). Quantidades excessivas de amoníaco dissolvidas nos excrementos líquidos também podem inibir o cultivo.

A máxima taxa de conversão de GBRB para PHAs obtida na concentração de 15 g.L⁻¹, foi de 0,19 g de PHAs por grama de GBRB, sendo significativamente mais elevada do que os relatados por Ibrahim e Steinbuchel (2010) (0,09 g por grama de GBRB em agitador orbital a 41 h/200 ° C/96 rpm) e Kawata e Aiba (2010) (0,13 g de PHAs por grama de GBRB em agitador orbital a 30 ° C/60 h/150 rpm). Wang et al. (2007) produziram PHAs em agitador orbital (30°C/16 h/200 rpm) com diferentes concentrações de glicose (10 - 50 g.L⁻¹) e obtiveram valores de produção entre 1,1 g.L⁻¹ e 12,3 g.L⁻¹.

Elevadas concentrações de GBRB (acima de 15 g.L⁻¹) resultaram em reduções nas produções de PHAs, passando de 2,81 g.L⁻¹ a 0,41 g.L⁻¹ (20 g.L⁻¹ de GBRB). Provavelmente na concentração mais elevada há um excesso de substrato, inibindo o microrganismo a fazer a conversão de GBRB à PHA. Esta diminuição na produção de PHAs também pode ser atribuída ao acúmulo de sódio no meio de cultura, uma vez que a GBRB apresenta 6,5% (m/m) de Na⁺. Mothes et al. (2007) testaram o efeito do acúmulo de P(3HB) em duas espécies bacterianas (*Cupriavidus necator* JMP 134 e *Paracoccus denitrificans*) utilizando GBRB do biodiesel, e relataram que a presença de íons de sódio foi determinada para verificar o efeito particularmente negativo tanto na taxa de crescimento, quanto na produção de polímero. Cavalheiro et al. (2009) relataram que as concentrações acima de 40 g.L⁻¹ de GBRB diminuíram a taxa de produção de PHAs quando a GBRB continham 3% (m/m) de Na⁺.

11.3 Influência das concentrações de GBRB e de nitrogênio na produção de Biomassa (Resposta Y₂)

As magnitudes dos coeficientes (Tabela 18) mostram que a concentração de nitrogênio (linear) exerce mais influência na produção de biomassa do que a concentração de GBRB (cerca de três vezes). Por outro lado, as concentrações de nitrogênio e de GBRB (quadráticos), apresentam magnitudes semelhantes. No entanto, o coeficiente de interação GBRB/nitrogênio tem efeito positivo, porém, menor do que os outros, em valores absolutos. A Figura 20 apresenta a superfície de resposta para a produção de biomassa em função dos diferentes valores de concentração de GBRB/nitrogênio (Tabela 17). A produção de biomassa é maximizada a 15 g.L⁻¹ de GBRB e 10 g.L⁻¹ de nitrogênio, e as concentrações que excedem ou menores deste valores, resultam em menores produções de biomassa.

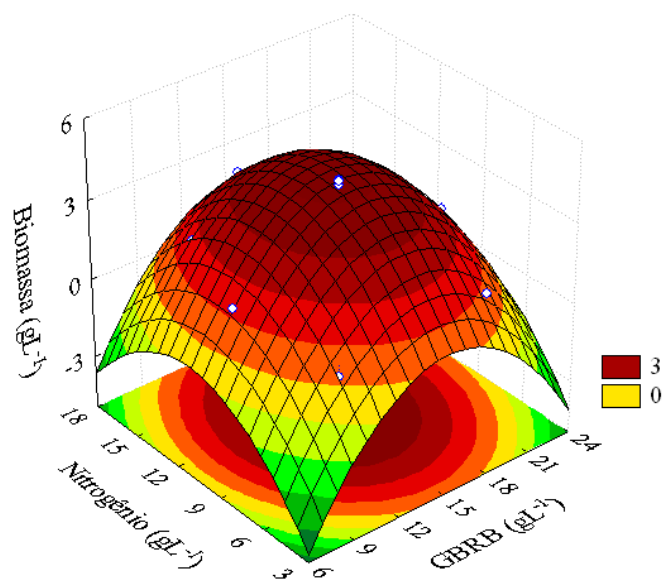


Figura 20: Efeito das concentrações de GBRB e de Nitrogênio na produção de biomassa em agitador orbital (35°C/72h/180rpm) por *Cupriavidus necator* IPT 026.

O valor máximo de produção de biomassa (4,34 g.L⁻¹) foi obtido no experimento 9 (Tabela 17), com 15 g.L⁻¹ de GBRB e 10 g.L⁻¹ de nitrogênio. O valor mínimo de produção de biomassa (0,15 g.L⁻¹) foi obtido no experimento 1 (Tabela 17), com 10 g.L⁻¹ de GBRB e 5 g.L⁻¹ de nitrogênio. Ashby et al. (2011) relataram uma produtividade máxima de células de 38 % após 72 horas de fermentação de GBRB por *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 em agitador orbital (30°C/24 h/200 rpm). Zhu et al. (2010) demonstraram que o aumento da concentração de glicerina de 3% a 9% resultou numa redução em cerca de 50% da biomassa microbiana de *Burkholderia cepacia* para uma fermentação de GBRB em agitador orbital (30°C/72 h/150 rpm). Efeitos semelhantes foram observados em um estudo realizado por Cavalheiro et al. (2009), que mostraram que concentrações superiores a 30 g.L⁻¹ de glicerol puro, a taxa de crescimento específico do *Cupriavidus necator* diminuiu por utilizar glicerol puro ou glicerina do biodiesel como única fonte de carbono.

O desempenho dos experimentos realizados (Tabela 17) confirmou o potencial para gerar biomassa com um elevado teor de PHAs, com acúmulo acima de 60% (m/m). O microrganismo estudado, *Cupriavidus Necator*, armazenou 78,34% de PHAs no experimento 2. Este valor é mais elevado do que os encontrados em muitos estudos que utilizaram GBRB como substrato (Ashby et al, 2011;. Dobroth et al, 2011; Cavalheiro et al, 2012).

11.4 Influência da variação das concentrações de GBRB e de nitrogênio nas propriedades dos PHAs

11.4.1 Infra-Vermelho com Transformada de Faurier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica valiosa para estudar os polímeros (incluindo poliésteres) e estimar interações, bem como alterações na morfologia dos componentes que combinam com as interações químicas e com a estrutura conformacional das moléculas. A Figura 21 mostra o espectro de FTIR da amostra de PHAs produzida em agitador orbital. Os espectros dos PHAs foram idênticos para todos os PHAs dos 11 experimentos (Tabela 17), portanto, apenas um espectro (experimento 7) representará todas as amostras que foram obtidas.

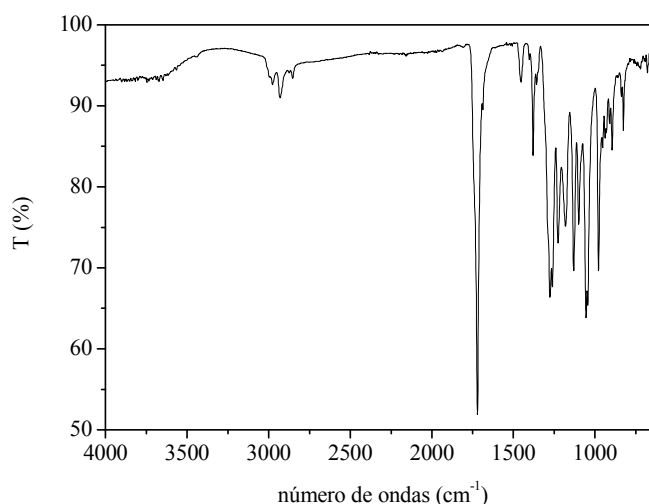


Figura 21: Espectro de FTIR obtido para PHAs produzidos a partir de GBRB.

Duas bandas principais aparecem no espectro de PHA: uma em 1724 cm^{-1} e outra em 1280 cm^{-1} , que correspondem a grupos $\text{C}=\text{O}$ e $\text{C}-\text{O}$, respectivamente (Hong et al., 1999; Rohini et al., 2006). Os picos relacionados com a deformação axial do grupo carbonila ($\text{C}=\text{O}$) em 1724 cm^{-1} , a vibração da carbonila do grupo éster (CC) a 978 cm^{-1} , a deformação angular no plano dos grupos simétricos (CH_3) a 1380 cm^{-1} e (CO) do grupo em 1279 cm^{-1} foram identificados nos PHAs produzidos a partir de GBRB, provando que poliésteres foram

obtidos. Estas bandas para PHAs produzido a partir de glicose também foram encontrados por Galego (2000).

11.4.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e Análise termogravimétrica (TG)

Os PHAs obtidos a partir do planejamento experimental foram analisados para avaliar as propriedades térmicas utilizando o parâmetro da temperatura de fusão, T_m (Figura 22, Tabela 20), que afeta significativamente as aplicações potenciais do polímero (Dobroth et al., 2011). Com base nos resultados de DSC, a T_m do PHA obtido no experimento 7 (184,3°C) foi o mais elevado, enquanto que o produzido no experimento 1 (157,2°C) foi o mais baixo. Os valores obtidos para a T_m de alguns PHAs obtidos a partir da GBRB coincidem com os valores relatados na literatura (174-183°C) para PHAs produzidos a partir de glicose (Anderson e Dawes, 1990; Gomez e Neto, 1997). Zhu et al., (2009) produziram PHAs utilizando a cepa *Burkholderia cepacia* a partir da GBRB em agitador orbital (150 rpm, pH 7,0, 30°C, 96h) e obtiveram T_m no valor de 181,9°C, enquanto que Garcia et al. (2013) obtiveram T_m de 155°C, para PHAs obtidos com o mesmo substrato, utilizando *Cupriavidus necator* em agitador orbital (250 rpm, pH 7, 30°C, 120h).

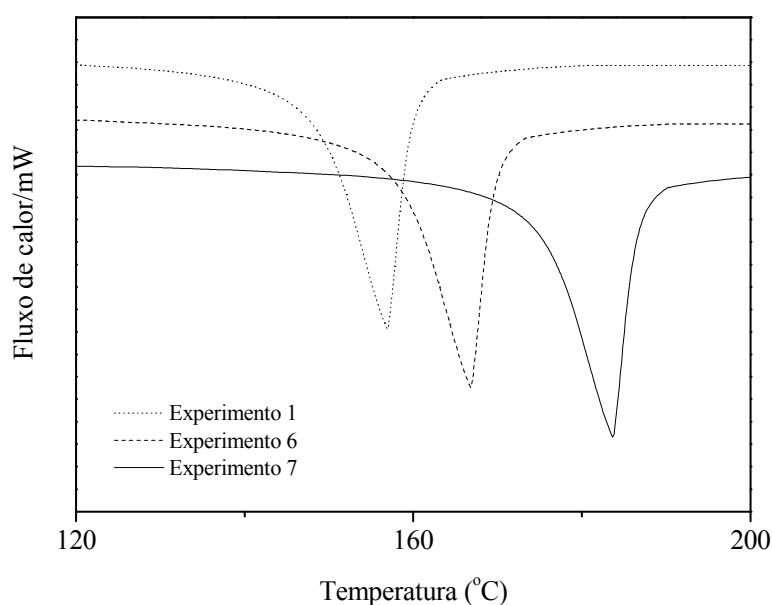


Figura 22: Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) para PHAs obtidos a partir de GBRB.

Tabela 20: Valores de T_m , $T_{on\ set}$, T_{decomp} e grau de cristalinidade para PHAs obtidos nos experimentos do planejamento experimental por *Cupriavidus necator* IPT 026 com GBRB em agitador orbital (35° C, 72 h, 180 rpm).

Experimento	T_m (°C)	$T_{on\ set}$ (°C)	T_{decomp} (°C)	Grau de cristalinidade (%)
1	157,2	276,0	298,9	55,19
2	164,8	288,3	316,1	62,54
3	172,8	298,6	309,3	56,97
4	160,9	302,8	314,1	64,06
5	172,7	303,9	318,7	58,02
6	167,1	304,1	316,5	60,37
7	184,3	306,8	327,4	52,23
8	175,9	290,2	304,5	66,12
9	167,6	297,5	308,1	59,43
10	166,9	294,9	306,2	59,58
11	167,1	295,4	307,4	59,82

Os valores de T_m para os PHAs produzidos neste estudo foram influenciados pela composição do meio fermentativo utilizado em cada experimento. O aumento da concentração de nitrogênio (3 g.L⁻¹ para 17 g.L⁻¹) e GBRB (15 g.L⁻¹ para 22 g.L⁻¹) diminuem o valor da T_m , provavelmente porque afeta a agragação da região cristalina.

A análise termogravimétrica também foi realizada para fornecer informações relativas à estabilidade térmica dos polímeros obtidos nos experimentos do planejamento estatístico (Tabela 17). De acordo com a Figura 23 e a Tabela 20, o PHA produzido no experimento 1 apresentou degradação térmica entre 276°C ($T_{on\ set}$) e 309,4 ° C, com um pico a 298,9 ° C (T_{decomp}). A perda total de massa neste intervalo de temperatura foi de 93,4%. Para o PHA obtido no experimento 7, a degradação térmica ocorreu entre 306,8°C ($T_{on\ set}$) e 334,1 ° C e apresentou um pico a 327,4 ° C (T_{decomp}), com perda total de massa de 96,5%. A elevada perda de massa pode indicar baixas quantidades de materia inorgânica no polímero. Wang et al. (2013) produziram PHAs a partir de sumo de beterraba, e obtiveram degradação térmica entre 255,14°C e 283,69°C, com um pico a 273,86°C. Zhu et al. (2009) produziram PHAs utilizando a cepa *Burkholderia cepacia* a partir da GBRB em agitador orbital (150 rpm,

pH 7,0, 30°C, 96h) e obtiveram T_{decomp} no valor de 281,5°C. Garcia et al. (2013) obtiveram T_{decom} de 271°C, para PHAs obtidos a partir da GBRB, utilizando *Cupriavidus necator* em agitador orbital (250 rpm, pH 7, 30°C, 120h).

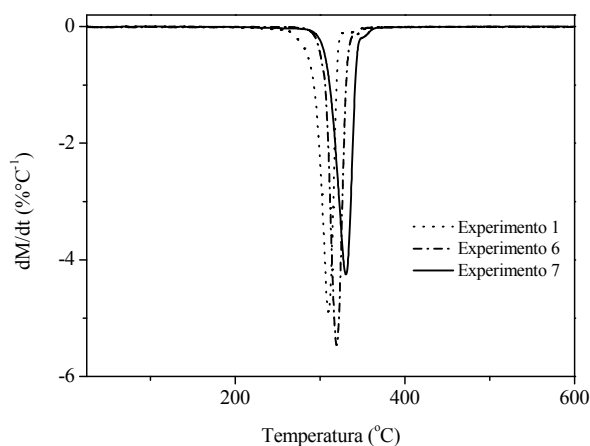


Figura 23: Análise termogravimétrica de PHAs obtidos a partir de GBRB.

Portanto a variação das concentrações de GRBB (8 g.L⁻¹ - 22 g.L⁻¹) e de nitrogênio (3 g.L⁻¹ para 17 g.L⁻¹) no meio de produção de PHAs (Tabela 17) resultaram numa variação de 276,0°C a 306,8°C nos valores de $T_{on\ set}$, mostrando que estes parâmetros exercem grande influência, causado provavelmente por diferenças estruturais em cada polímero.

As temperaturas de decomposição mais elevadas proporcionam uma maior separação em relação à temperatura de fusão, requisito importante para a moldagem por extrusão do polímero, evitando a degradação térmica dos polímeros durante seu processamento.

11.4.3 Difração de raio-X (DRX)

A cristalinidade de PHAs obtidos a partir de GBRB (Tabela 17) foi avaliada (Figura 24, Tabela 20). Com base nos resultados de DRX, o grau de cristalinidade do PHA produzido no experimento 7 foi de 52,23%. Esta cristalinidade foi considerada a melhor de todos os PHAs produzidos no planejamento experimental. O grau de cristalinidade obtido para PHAs deste estudo foi melhor do que os relatados por Bengtsson et al. (2010) e Lee (1996) (58% e 65%, respectivamente) para PHAs produzidos por glicose. Um baixo grau de cristalinidade

aumenta o número de possíveis aplicações industriais de PHAs, melhorando as suas características de processamento. Garcia et al. (2013) obtiveram grau de cristalinidade de 49% para PHAs obtidos a partir da GBRB utilizando *Cupriavidus necator* em agitador orbital (250 rpm, pH 7, 30°C, 120h).

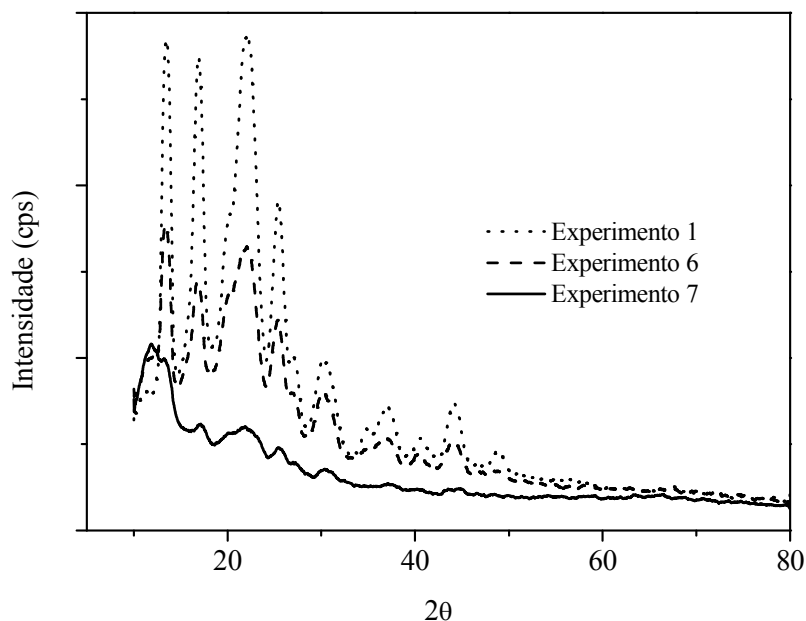


Figura 24: Análise de DRX para PHAs obtidos a partir da GBRB.

Portanto, o grau de cristalinidade dos PHAs obtidos nestes experimentos (Tabela 17) também foram influenciados pela composição do meio fermentativo utilizado no planejamento experimental, variando de 52,23% a 66,12% dependendo das concentrações de GBRB e de nitrogênio no meio de produção.

11.4.4 Massa molar (MM)

A Figura 25 apresenta os cromatogramas obtidos por CLAE-IR para os PHAs produzidos em agitador orbital (Tabela 17). Os PHAs produzidos nos experimentos 1, 6 e 7 apresentaram massas molares de 510 kDa, 615 kDa e 780 kDa, respectivamente (Figura 25, Tabela 21). A massa molar dos diferentes PHAs foi dependente da composição do meio

fermentativo, com variação de 510 a 780 kDa dependendo das composição do meio de produção em cada experimento (Tabela 17). Segundo TANAKA et al. (1994), a bactéria *Cupriavidus necator*, produz o polímero de alta massa molar.

Sabe-se que o substrato presente no meio fermentativo durante a fase de acúmulo de PHAs por *Cupriavidus necator* pode atuar como agentes de transferência de cadeia na etapa de polimerização (MADDEN et al., 1999). Assim, diferentes substratos podem originar polímeros com diferentes comprimentos de cadeia. Para os experimentos do planejamento estatístico, que utilizaram a GBRB como único substrato, este efeito pode ser explicado pela diferença na composição do meio fermentativo, visto que, a relação C:N foi diferente em cada experimento. Os valores de MM são comparáveis aos obtidos por Mothes et al. (2007) e Cavalheiro et al. (2009) para PHAs produzido a partir da glicerina por *Cupriavidus necator*, 620 kDa e 960 Kda, respectivamente e e similar (750 kDa) ao obtido por Madden et al. (1999).

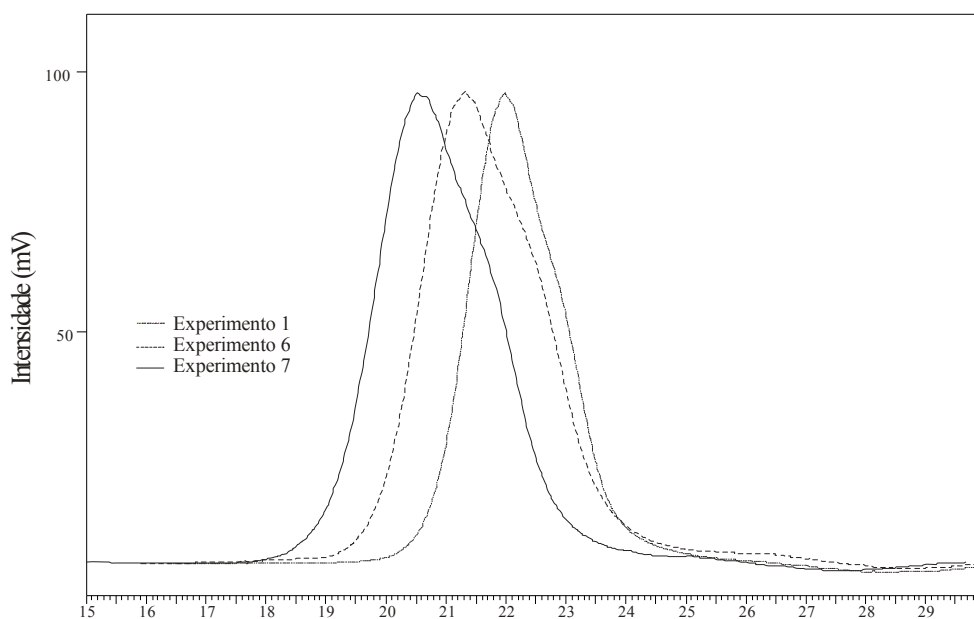


Figura 25: Cromatograma CLAE-IR para os PHAs obtidos a partir da GBRB.

Zhu et al. (2009) produziram PHAs utilizando a cepa *Burkholderia cepacia* a partir da GBRB em agitador orbital (150 rpm, pH 7,0, 30°C, 96h) e obtiveram MM de 304 kDa na concentração de 3 % de glicerol no meio fermentativo e 162 kDa quando utilizou concentração de 9 %, ou seja o aumento na concentração de glicerol, provocou redução na

MM do biopolímero produzido. Kawata e Alba (2010), obtiveram MM de 140 KDa, para PHAs obtidos a partir de GBRB, utilizando *Halomonas sp* em agitador orbital (150 rpm, pH 7, 30°C, 60h).

Tabela 21: Tempo de retenção (Tr) e massa molar (MM) de PHAs obtidos a partir de GBRB em agitador orbital.

	Tr (min)	MM (KDa)
Experimento 1	20,72	745
Experimento 2	21,75	570
Experimento 3	21,08	700
Experimento 4	21,97	555
Experimento 5	21,19	680
Experimento 6	21,64	615
Experimento 7	20,41	780
Experimento 8	22,12	510
Experimento 9	21,36	650
Experimento 10	21,34	650
Experimento 11	21,30	645

Mesmo que a estrutura química do biopolímero seja a mesma, diferentes massas molares podem alterar significativamente as propriedades dos PHAs (física, mecânica, térmica, reológicas, processamento e outros). Portanto, as propriedades dos PHAs dependem do tamanho da cadeia polimérica. A massa molar média e a sua distribuição podem ser influenciadas pela composição do meio de produção, e variações nas concentrações de GBRB e de nitrogênio e nas relação C:N, podem justificar as diferenças da MM obtidas, consequentemente as propriedades térmicas e de cristalinidade (Tabela 20).

Devido à concorrência industrial, a capacidade de controlar a massa molar do biopolímero durante a produção e a compreensão de como a massa molar influencia nas propriedades finais do polímero são extremamente importantes.

Esta diferença de comportamento observada nas diferentes propriedades dos PHAs obtidos nos 11 experimentos (Tabela 17), também pode provavelmente ser atribuída a uma diferença na composição estrutural do polímero durante a biossíntese. Este rearranjo estrutural pode ser resultado de uma variação no grau de polimerização, formando cadeias mais ou

menos longas. Para os biopolímeros com maiores massas molares, ocorre maior estabilidade sob aquecimento.

11.4.5 Composição monomérica

A Figura 26 mostra os cromatogramas obtidos por GC-MS das amostras de PHAs produzidos nos experimentos 1 (baixas propriedades) e 7 (melhores propriedades) em comparação com o perfil monomérico do PHB padrão Sigma e pelos espectros de massas da biblioteca NIST. As amostras de PHAs produzidos consistem principalmente do monômero de 3-hidroxi-butarato (3HB), identificado pelo tempo de retenção de 5.79' no cromatograma do do padrão de 3-hidroxi-butarato. Entretanto, os cromatogramas e a Tabela 22 mostram que mais de um monômero está presente nas amostras de PHA produzidos neste estudo.

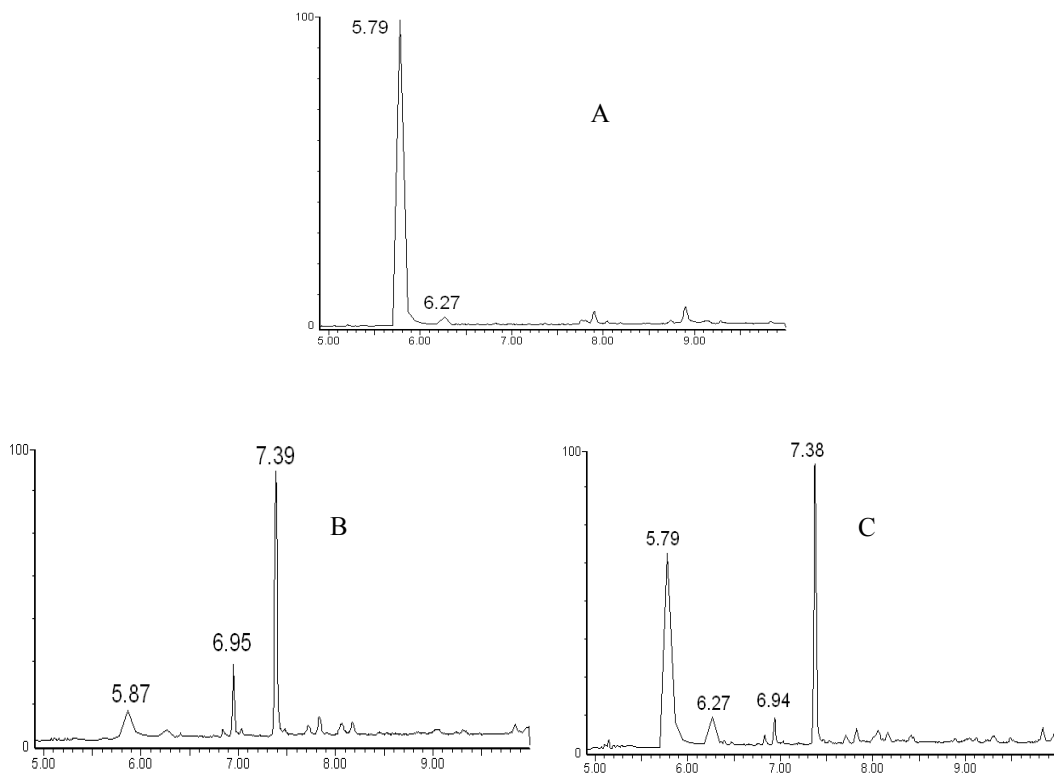


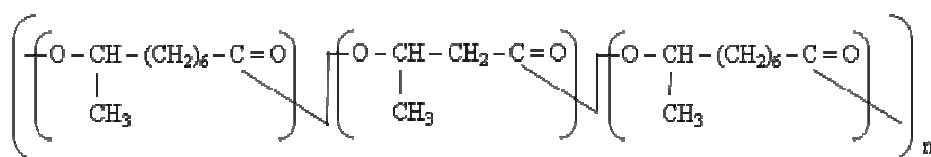
Figura 26: Cromatogramas GC/MS: (A) PHB Padrão (Sigma-Aldrich); (B) PHA produzido no experimento 1 e (C) PHA produzido no experimento 7.

Tabela 22: Perfil monomérico de PHAs (padrão e produzidos em agitador orbital).

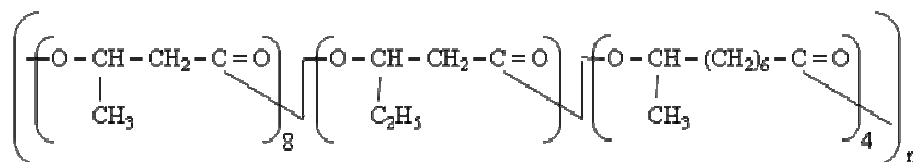
Tempo de retenção (min)	Monômero	PHA Padrão	PHA experimento 1	PHA experimento 7
5,79	3-hidroxibutirato (%)	97,01	23,80	56,05
6,27	3-hidroxipentanoato (%)	0,87	---	7,85
7,38	8-hidroxinonanoato (%)	---	55,74	27,82
---	Outros não identificados (%)	2,12	20,46	8,29

O monômero 3-hidroxipentanoato (6,27'), também foi identificado nas amostras, e o pico presente em 7,38' foi identificado como monômero de 8-hidroxinonanoato pela biblioteca da NIST. Portanto, as diferentes composições do meio fermentativo resultaram em polímeros de PHAs com diferente composição monomérica, além de diferentes massas molares médias, explicando as diferenças nas propriedades térmicas, e de cristalinidade resultantes (Tabela 20, Tabela 21, Tabela 22).

A representação esquemática de uma possível composição química dos PHAs (Experimento 1 e 7) produzidos por *Cupriavidus necator* IPT 026 a partir da fermentação de GBRB em agitador orbital (35° C, 72 h, 180 rpm) está indicada na Figura 27. Vale salientar que não foi determinada a ordem sequencial de hidróxi-ésteres que compõem as unidades repetidoras da estrutura de cada polímero.



PHA Experimento 1. Poli-3-hidroxibutirato-CO-8-hidroxinonanoato



PHA Experimento 7. Poli-3-hidroxibutirato-CO-3-hidroxipentanoato-CO-8-hidroxinonanoato

Figura 27: Representação esquemática de uma possível composição química dos PHAs produzidos por *Cupriavidus necator* IPT 026 a partir da fermentação de GBRB em agitador orbital (35°C, 72 h, 180 rpm).

O PHA produzido pela bactéria *Cupriavidus necator* IPT 026 a partir da fermentação de GBRB em agitador orbital (15 g.L⁻¹ de GBRB, 10 g.L⁻¹ de Nitrogênio, 35°C, 72 h, 180 rpm) não é um P(3HB), e contem além do 3-hidroxi-butirato, as unidades repetidoras de 3-hidroxi-pentanoato ou 3-hidroxi-nonanoato, mostrando a grande influencia da composição do substrato na composição do polímero (Figura 27).

A diferença das concentrações de GBRB e de nitrogênio no meio fermentativo, utilizadas para o experimento 1 e 7 (Tabela 17) resultou em mudanças na composição do biopolímero. Na condição do experimento 1 não foi inserido 3-hidroxi-pentanoato no polímero acumulado, enquanto na condição do experimento 7 além deste éster foi inserido também relativa quantidade de 8-hidroxi-nonanoato. Portanto, a condição dos experimentos exerce grande influencia na composição química do biopolímero, justificando as diferenças nas propriedades obtidas (Tabela 20, Tabela 21).

11.5 Conclusões parciais

As máximas produções de PHAs e de biomassa (2,81 g.L⁻¹ e 4,34 g.L⁻¹, respectivamente) por fermentação de GBRB com *Cupriavidus necator* IPT 026 em agitador orbital (35°C, 72h e 180 rpm), foram obtidos no experimento 9 (15 g.L⁻¹ de GBRB e 10 g.L⁻¹ de nitrogênio) com aproximadamente 65% de acúmulo do biopolímero nas células.

As concentrações de GBRB e de nitrogênio otimizadas para maximizar a produção de PHAs e de biomassa foram de 14,983 g.L⁻¹ e 9,86 g.L⁻¹, respectivamente.

O substrato utilizado neste estudo (GBRB) contém uma quantidade significativa de sódio resultante do processo de transesterificação. Este teor de sódio, e possivelmente outros contaminantes se acumulam no meio fermentativo durante o curso da fermentação podendo inibir o acúmulo do biopolímero na célula bacteriana a partir de determinada concentração.

A variação das concentrações de GBRB e de nitrogênio resultou em alterações nas propriedades térmicas e de cristalinidade, justificada pelas variações na massa molar e na composição do biopolímero.

O PHA produzido no experimento 9, apresentou T_m de 167,6°C, grau de cristalinidade de 59,43%, temperatura de degradação entre 297,5°C e 314,1°C com pico a 308,1°C, massa molar de 650 kDa.

No entanto, é necessário avaliar a produção em sistema de fermentação maior (biorreator) e com variação das condições operacionais, etapa imprescindível e determinante na tentativa de maximizar a produção de PHAs e reduzir os custos de produção do biopolímero.

12 Influência de diferentes sistemas de fermentação na produção e nas propriedades de PHAs obtidos a partir de GBRB

Para avaliar a influência de diferentes sistemas de fermentação na produção e nas propriedades de PHAs obtidos a partir de GBRB, utilizando *Cupriavidus necator* IPT 026, realizou-se cultivos nas condições otimizadas em agitador orbital (15 g.L⁻¹ de GBRB, 10 g.L⁻¹ de nitrogênio, 35°C, 72h e 180 rpm) e em biorreator (15 g.L⁻¹ de GBRB, 10 g.L⁻¹ de nitrogênio, 35°C, 96h, 500 rpm e 1vvm). As condições de produção em agitador orbital foram iguais às do ponto central, onde ocorreu maior produção de PHAs (experimento 9). Para a produção em biorreator às condições foram semelhantes ao agitador orbital, entretanto com aumento da velocidade de rotação e taxa de aeração, e acompanhados ao longo da fermentação.

12.1 Produção de PHAs em agitador orbital e biorreator

A Figura 28 apresenta os valores das produções de biomassa e de PHAs em biorreator. O acúmulo máximo de PHAs foi 5,01 g.L⁻¹ em 72h de fermentação. Após este tempo, a quantidade de PHAs produzida diminuiu. O comportamento da produção de biomassa foi similar, com máximo produzido de 6,11 g.L⁻¹ em 72h, e acúmulo nas células de 82 %. FIORESE (2008) salienta que o biopolímero pode sofrer degradação intracelular ocorrendo, via de regra, em condições de cultura opostas àquelas onde se observa o seu acúmulo, ou seja, em situações onde haja pouca disponibilidade da fonte de carbono, e não haja limitação de outras necessidades nutricionais.

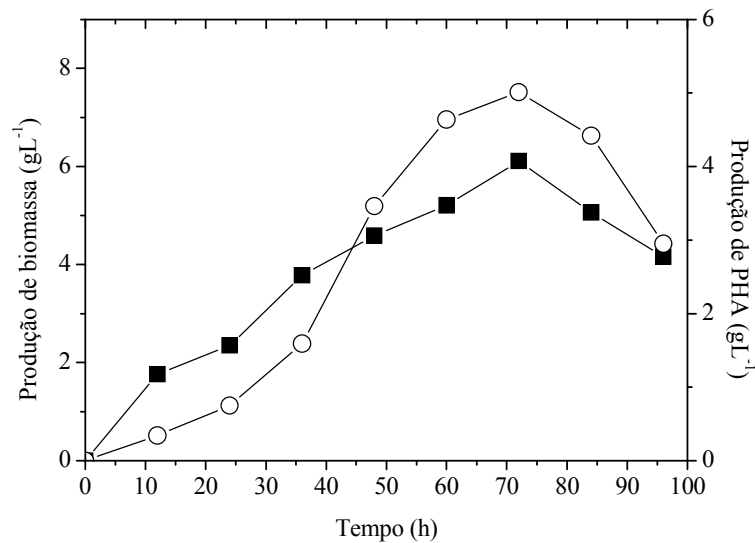


Figura 28: Produções de biomassa (■) e de PHAs (○) por fermentação de GBRB em biorreator 4,5L (35°C, 72 h, pH 7.0, taxa de aeração de $L \text{ min}^{-1}$, 500 rpm).

O processo de fermentação em biorreator praticamente dobrou a produção de PHAs em comparação com a quantidade produzida em agitador orbital (2,81 g.L^{-1}). A produção de biomassa observada foi de 4,34 g.L^{-1} após 72h em agitador orbital, enquanto que no mesmo tempo de fermentação, obteve-se 6,11 g.L^{-1} em biorreator. Com relação ao acúmulo de PHAs nas células do microrganismo, verificou-se um aumento de aproximadamente 27%, indicando uma melhor eficiência no processo em biorreator. Provavelmente o aumento no processo fermentativo foi devido a dois fatores, primeiro, o controle da taxa de aeração na fermentação, situação que é difícil em agitador orbital, segundo, a transferência de massa no vaso do biorreator é mais eficiente e efetiva do que no frasco em agitador orbital. Esses dois fatores promovem uma maior transferência de massa, favorecendo assim, a produção de PHAs nas células do microrganismo. Este aumento da produção de PHAs também foi relatada por Cavalheiro et al. (2009) e Mothes et al. (2007), que também utilizaram GBRB como substrato.

12.2 Influência de diferentes sistemas de fermentação de GBRB nas propriedades de PHAs

12.2.1 Infra-Vermelho com Transformada de Faurier (FTIR)

A Figura 29 mostra que o espectro de FTIR dos PHAs produzidos em agitador orbital e biorreator são semelhantes.

Os espectros mostram duas bandas principais a 1724 cm^{-1} e 1280 cm^{-1} , que correspondem a C = O e C - O, respectivamente (BLUHM et al., 1986;. HONG et al., 1999; ROHINI et al., 2006). Como confirmação de que os biopolímeros produzidos são poliésteres, aparecem também, as bandas relacionadas com a deformação axial do grupo carbonila (C = O), em 1724 cm^{-1} , com a vibração da carbonila do grupo éster (CC) a 978 cm^{-1} , com a deformação angular no plano dos grupos simétricos (CH_3) a 1380 cm^{-1} , e uma banda relacionada ao grupo (CO) à 1279 cm^{-1} . Estes mesmos picos foram descritos por Galego (2000).

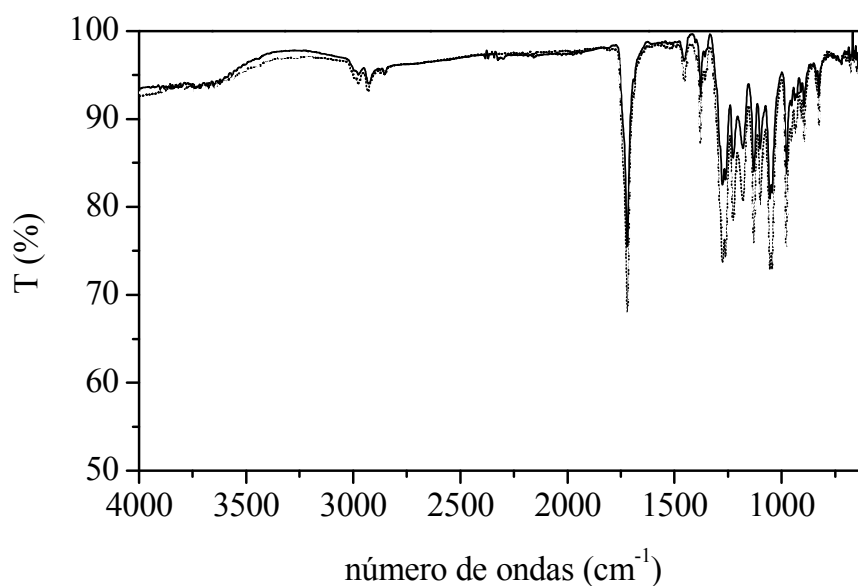


Figura 29: Espectros de FTIR: (....) PHA biorreator, (—) PHA agitador orbital.

12.2.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e Análise termogravimétrica (TG)

De acordo com a Figura 30, o PHA produzido em agitador orbital apresentou T_m de $167,6^\circ\text{C}$. Para o PHA produzido em biorreator, a T_m foi de $192,4^\circ\text{C}$, o que representa um aumento de 15% em relação ao PHA obtido em agitador orbital.

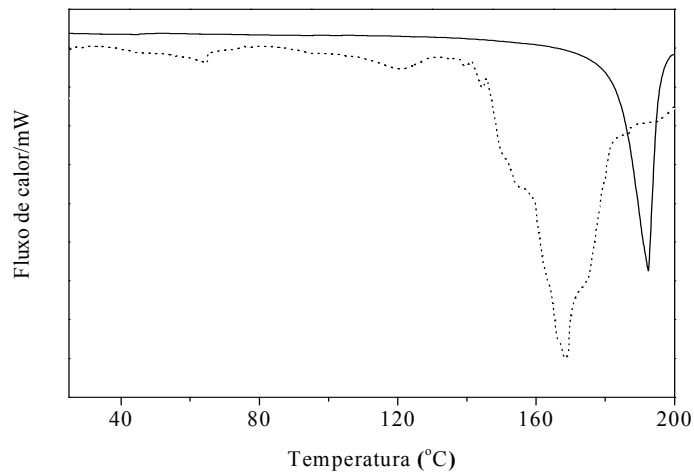


Figura 30: Análise de DSC: (—) PHA biorreator e (...) PHA agitador orbital.

A análise termogravimétrica foi realizada para os polímeros obtidos em agitador orbital e biorreator. De acordo com a Figura 31, o PHA produzido em agitador orbital apresentou degradação térmica entre 297,5°C ($T_{on\ set}$) e 314,1°C, com um pico a 308,1°C (T_{decomp}). A perda total de massa dentro desta temperatura foi de 91,6%. Para o PHA obtido em biorreator a degradação térmica ocorreu entre 317,4°C ($T_{on\ set}$) e 344,5°C, com um pico a 337,8°C (T_{decomp}) e perda de massa de 96,5%. Portanto, o PHA produzido em biorreator apresenta um aumento de 10 % na temperatura de degradação. Elevada temperatura de decomposição favorece o processamento do biopolímero, proporcionando maior número de aplicações industriais.

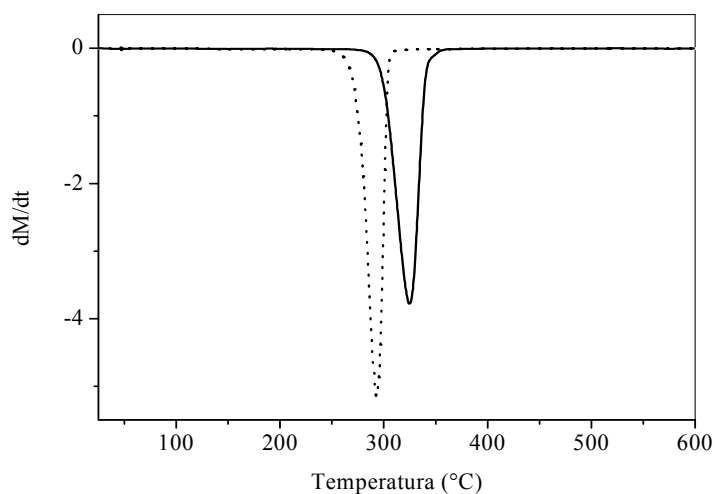


Figura 31: Análises termogravimétricas: (...) PHA agitador orbital e (—) PHA biorreator.

O PHA produzido em biorreator apresentou melhores propriedades térmicas do que o produzido em agitador orbital, indicando que a mudança no sistema de produção favoreceu essas propriedades, e conseqüentemente as aplicações principalmente de processo de extrusão..

12.2.3 Difração de raio-X (DRX)

A cristalinidade dos PHAs produzidos a partir da GBRB foi avaliada (Figura 32). Com base nos resultados de DRX, o grau de cristalinidade do PHA produzido em agitador orbital foi de 59,43%. Para o PHA produzido em biorreator, o grau de cristalinidade foi de 50,23%, ocorrendo redução de 15% em relação ao biopolímero produzido em agitador orbital. O grau de cristalinidade obtidos para os PHAs neste estudo foram melhores do que os relatados por Bengtsson et ai. (2010) e Lee (1996) (58% e 65%, respectivamente).

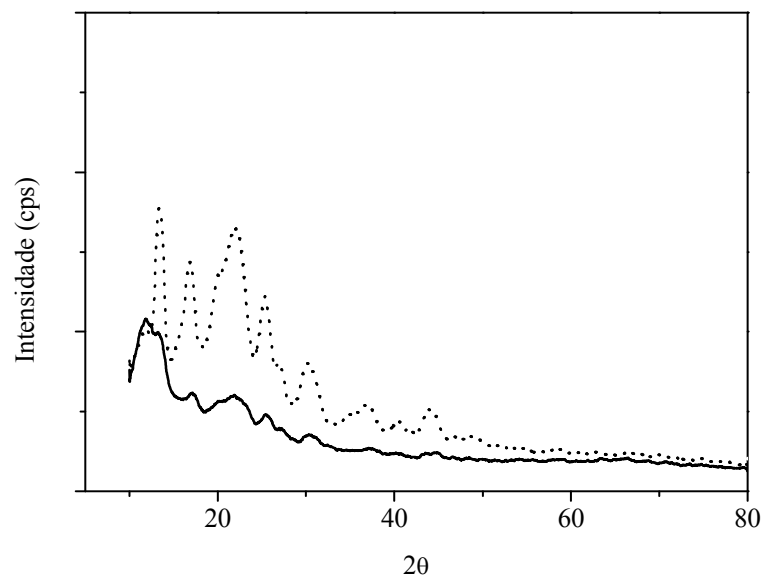


Figura 32: Análise de DRX: (...) PHA agitador orbital e (—) PHA biorreator.

A diminuição no grau de cristalinidade ao aumentar o sistema de fermentação de GBRB por *Cupriavidus necator* IPT 026, aumenta o número de possibilidades de aplicações industriais do PHA, pois melhora as as características de processamento.

12.2.4 Massa molar (MM)

A Figura 33 apresenta os cromatogramas obtidos por CLAE-IR dos PHAs produzidos em agitador orbital e em biorreator. A massa molar dos PHAs foi dependente do sistema de fermentação. O PHA produzido em agitador orbital apresentou massa molar de 650 kDa, enquanto que o PHA obtido em biorreator apresentou massa molar de 860 kDa (Tabela 23).

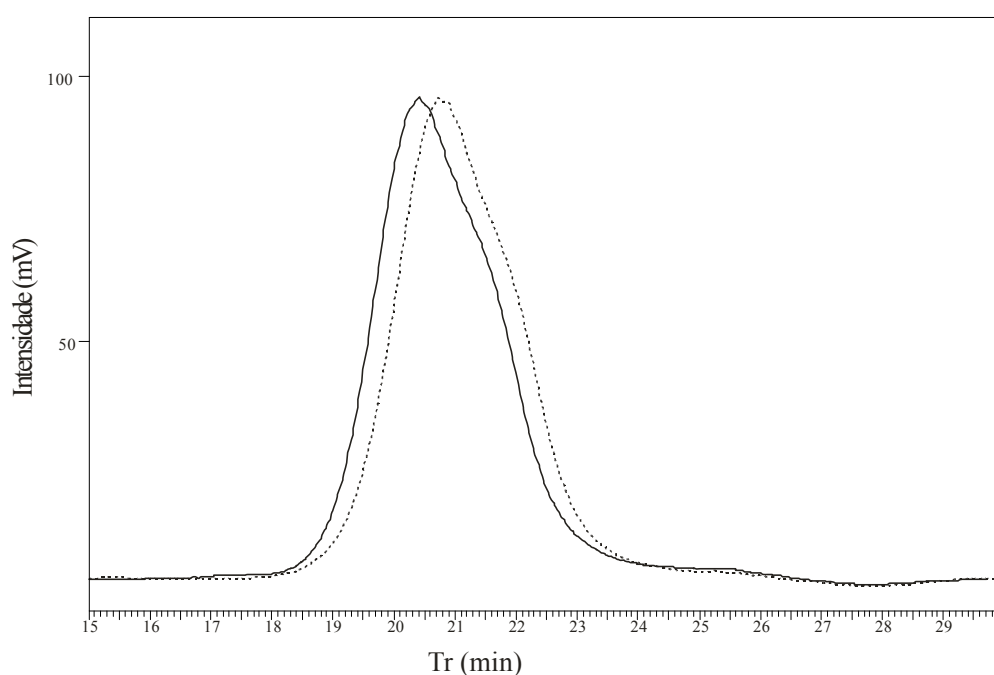


Figura 33: Cromatogramas por CLAE-IR: (....) PHA agitador orbital e (—) PHA biorreator.

Tabela 23: Tempo de retenção (Tr) e massa molar de PHAs produzidos em agitador orbital e biorreator.

Sistema de fermentação	Tr (min)	Mw (KDa)
PHA agitador orbital	21,16	780
PHA biorreator	20,95	860

A massa molar do PHA produzido em biorreator apresentou aumento de 10% em relação à massa molar do PHA obtido em agitador orbital. Provavelmente, ocorreu maior eficiência do sistema (biorreator) que tem maior velocidade de agitação e melhor taxa de

aeração, resultando em ativação do sistema enzimático das polimerases do microrganismo, aumentando o tamanho de cadeia do biopolímero produzido.

12.2.5 Composição monomérica

A Figura 34 apresenta os cromatogramas obtidos por GC-MS das amostras de PHAs produzidos em agitador orbital e biorreator. A Tabela 24 apresenta as composições monoméricas identificadas a partir do tempo de retenção, por comparação do tempo de retenção do padrão de 3-hidroxi-butirato e em função dos espectros de massas de cada pico por comparação com os espectros da biblioteca NIST.

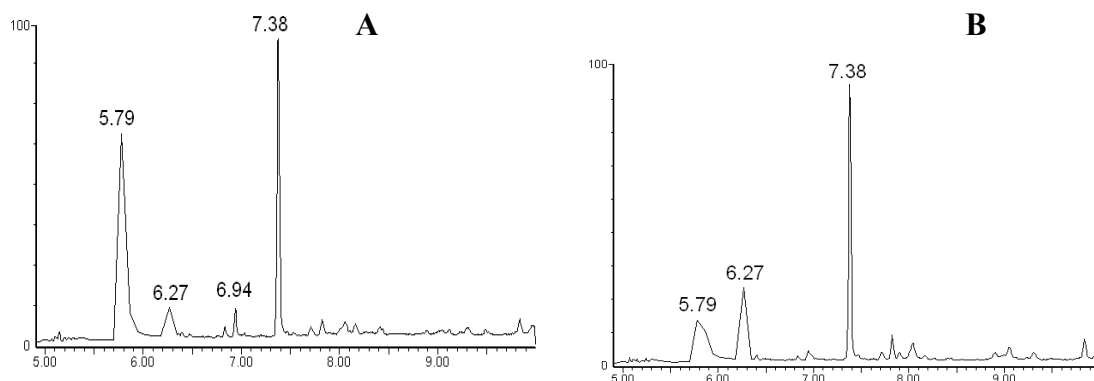


Figura 34: Cromatogramas GC/MS: (A) PHA agitador orbital e (B) PHA biorreator.

Tabela 24: Composição monomérica dos PHAs produzidos em agitador orbital e biorreator por *Cupriavidus necator* IPT 026 por fermentação da GBRB.

Tempo de retenção (min)	Monômeros	PHA agitador orbital	PHA biorreator
5,79	3-hidroxi-butirato (%)	32,63	28,82
6,27	3-hidroxi-pentanoato (%)	6,51	19,49
7,38	8-hidroxi-nonanoato (%)	47,82	44,35
---	Outros não identificados (%)	13,04	7,34

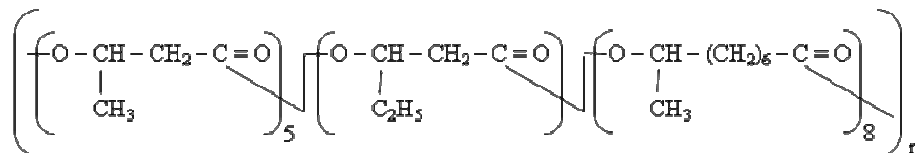
O principal constituinte dos PHAs produzidos é o monômero de 3-hidroxi-butirato (3HB), indicada pelo tempo de 5,79, independente do sistema de fermentação utilizado. Entretanto, foram identificados outros monômeros que compõem a estrutura dos PHAs obtidos em agitador orbital e em biorreator, como o 3-hidroxi-pentanoato e 8-

hidroxinonanoato, mas em diferentes percentuais, dependendo do sistema de fermentação utilizado.

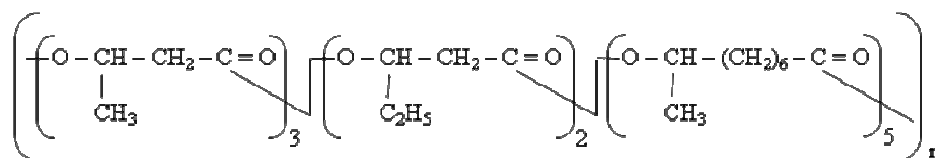
Comparando-se os efeitos do sistema de fermentação na composição química dos biopolímeros, verifica-se uma redução de 10% no teor de 3-hidroxi-butirato, um aumento de 200 % no teor de 3-hidroxi-pentanoato e uma diminuição de 8% para o monômero 8-hidroxi-nonanoato, quando comparados os PHAs produzidos em agitador orbital com o obtido em biorreator.

Assim, os resultados apresentados na Tabela 24 demonstram que as composições monoméricas de PHAs obtidos em diferentes sistemas de fermentação são variadas e diferindo de forma considerável entre si. As variações no comprimento e composição dos biopolímeros determinam as diferenças nas propriedades térmicas e de cristalinidade obtidas, assim aumentam a variedade e diversidade de aplicações industriais do biopolímero.

A representação esquemática de uma possível composição química dos PHAs produzidos por *Cupriavidus necator* IPT 026 a partir da fermentação de GBRB em diferentes sistemas de cultivo, agitador orbital (15 g.L⁻¹ de GBRB, 10 g.L⁻¹ de nitrogênio, 35°C, 72h e 180 rpm) e biorreator (15 g.L⁻¹ de GBRB, 10 g.L⁻¹ de nitrogênio, 35°C, 96h, 500 rpm e 1vvm) está indicada na Figura 35. Ressalta-se também que não foi determinada a ordem sequencial de hidróxi ésteres que compõem as unidades repetidoras da estrutura de cada polímero.



PHA Agitador orbital: Poli-3-hidroxi-butirato-CO-3-hidroxi-pentanoato-CO-8-hidroxi-nonanoato



PHA Biorreator: Poli-3-hidroxi-butirato-CO-3-hidroxi-pentanoato-CO-8-hidroxi-nonanoato

Figura 35: Representação esquemática de uma possível composição química dos PHAs produzidos por *Cupriavidus necator* IPT 026 a partir da fermentação de GBRB em diferentes sistemas de cultivo: agitador orbital (15 g.L⁻¹ de GBRB, 10 g.L⁻¹ de nitrogênio, 35°C, 72h e 180 rpm) e biorreator (15 g.L⁻¹ de GBRB, 10 g.L⁻¹ de nitrogênio, 35°C, 96h, 500 rpm e 1vvm).

A composição química de ambos os PHAs produzidos nos dois sistemas de cultivo de GBRB por *Cupriavidus necator* IPT 026 (agitador orbital e biorreator), contém na estrutura unidades repetidoras de hidróxi ésteres contendo 4C, 5C e 9C, entretanto em diferentes proporções a depender do modo de cultivo (Figura 35). Ao passar do sistema de cultivo de agitador orbital para biorreator, a quantidade de hidróxi ésteres de 4C e 9C diminuiu, aumentando a quantidade de 3-hidroxipentanoato. Considerando que a bactéria, a composição do meio de cultivo, a temperatura (35°C) foram iguais nos dois sistemas, o volume (80 mL ou 3L) e as condições de agitação (250 rpm, 500 rpm) e aeração (não controlada na incubadora rotatória, e 1vvm no bioreator) são responsáveis pela diferença na proporção destes hidróxi ésteres da composição do polímero.

Portanto, as condições de aeração e agitação exercem grandes influências na composição do polímero e necessitam ser avaliadas com maior profundidade.

12.3 Conclusões parciais

A mudança do sistema de fermentação de 15 g.L⁻¹ de GBRB e 10 g.L⁻¹ de nitrogênio pelo microrganismo *Cupriavidus necator* IPT 026 de agitador orbital (35°C, 72h e 180 rpm) para biorreator (35°C, 96h, 500 rpm e 1vvm) resultou num aumento de 54 % na produção de PHAs.

Os PHAs produzidos a partir do experimento em biorreator apresentou melhores propriedades térmicas, cristalinidade e massa molar dos PHAs produzidos em agitador orbital. As diferentes propriedades dos PHAs pode ser atribuída a diferença na composição e tamanho dos biopolímeros durante a biossíntese. Este rearranjo estrutural pode ter sido causado pela formação de cadeias que são mais estáveis termicamente. Além disso, essas diferenças nas propriedades podem ser explicadas pela influência das condições do processo na fermentação, como maior velocidade de agitação e taxa de aeração que resultam em maior transferência de massa no sistema de fermentação.

A composição química dos biopolímeros obtidos em agitador orbital e em biorreator apresentaram os mesmos monômeros, 3- hidroxibutirato (3HB), 3- hidroxipentanoato e 8- hidroxinonanoato, com diferentes percentuais, a depender do sistema de fermentação.

Os PHAs obtidos neste estudo apresentaram propriedades e características adequadas para muitas utilizações comerciais.

O processo de produção em biorreator foi superior ao processo de produção e agitador orbital em todos os aspectos analisados. Houve aumento na produção de PHA, além da obtenção de um biopolímero com melhores propriedades.

No entanto, é necessário realizar estudos mais detalhados sobre a fermentação em biorreator, com o intuito de avaliar as condições do processo de fermentação, como, a influência da taxa de aeração e a velocidade de agitação sobre a produção de PHAs.

13 Influência da taxa de aeração e da velocidade de agitação na produção de PHAs em biorreator a partir de GBRB por *Cupriavidus necator* IPT 026: otimização, cinética e propriedades

Foi realizado um planejamento estatístico DCCR para avaliar os efeitos da taxa de aeração e da velocidade de agitação nas produções de biomassa e de PHAs. Os níveis da taxa de aeração e da velocidade de agitação variaram de acordo com o planejamento de experimentos. Todos os experimentos foram conduzidos em biorreator (15 g.L⁻¹ de GBRB e 10 g.L⁻¹ de nitrogênio, C:N de 0,6) a 35°C, 72 horas, pH 7,0, utilizando a cepa *Cupriavidus necator* IPT 026.

A Tabela 25 mostra os valores das variáveis independentes codificadas e não codificadas de acordo com o planejamento experimental e as respostas (produção de PHA, Y_1 , e produção de biomassa, Y_2) para todos os experimentos. Cada linha representa um experimento realizado em biorreator. Os experimentos foram randomizados para minimizar os efeitos de variáveis inexplicadas nas respostas observadas devido a fatores externos. A apresentação ordenada na Tabela 25 foi utilizada para facilitar a visualização.

Tabela 25: Planejamento experimental (condições e respostas) para produção de PHAs e biomassa em biorreator (35°C, 72 h) por *Cupriavidus necator* IPT 026 com GBRB.

Experimento	Taxa de aeração		Velocidade de agitação		Produção de PHAs Y ₁ (g.L ⁻¹)	Produção de Biomassa Y ₂ (g.L ⁻¹)	Extração (%)
	Valor codificado	Valor real	Valor codificado	Valor real			
	(X ₁)	(vvm)	(X ₂)	(rpm)			
1	-1	0,5	-1	250	0,20	0,23	86,96
2	-1	0,5	1	750	2,24	2,43	92,18
3	1	1,5	-1	250	0,75	1,01	74,26
4	1	1,5	1	750	2,82	3,76	74,92
5	-1,41	0,3	0	500	1,49	2,08	71,63
6	1,41	1,7	0	500	2,04	2,46	82,93
7	0	1	-1,41	146	0,53	0,68	77,94
8	0	1	1,41	854	2,54	3,42	74,27
9	0	1	0	500	4,90	6,57	74,58
10	0	1	0	500	4,98	6,46	77,09
11	0	1	0	500	4,85	6,40	75,78

13.1 Análise dos dados experimentais

A análise estatística foi realizada a um nível de significância de 95%. A Tabela 26 apresenta a estimativa dos coeficientes de regressão (utilizando valores codificados). Quando o modelo de regressão é determinado com valores codificados das variáveis, o valor de cada coeficiente mostra diretamente a importância de cada efeito nas respostas do planejamento experimental.

Os coeficientes de determinação (R^2), indicam o valor percentual explicado na respostas a partir do modelo de regressão. Como mostrado na Tabela 26, que lista os coeficientes de determinação do modelo, a produção de PHAs e a produção de biomassa, foram explicadas em 99,1% e 98,8%, respectivamente.

Os valores t que são zero, e correspondem à hipótese nula. Um valor de $p < 0,05$ sugere menos de 5% de probabilidade de que a hipótese nula seja verdadeira (isto é, rejeita a hipótese nula). A interação entre a taxa de aeração e a velocidade de agitação não é significativa para as produções de PHAs e de biomassa.

Tabela 26: Coeficientes estimados de determinação múltipla para produção de PHAs (A) e de biomassa (B) utilizando valores codificados.

Termo	Coeficiente	SE Coeficiente	<i>t</i>	<i>p</i>
(A) Produção de PHAs [S = 0,0536828/R ² = 0,99136/R ² (adj)=0,98272]				
Média/Interação	4,91000	0,133769	36,7049	0,000000
Taxa de aeração	0,23848	0,081917	2,9112	0,033353
Taxa de aeração x Taxa de aeração	-1,60938	0,097500	-16,5063	0,000015
Velocidade de agitação	0,86907	0,081917	10,6092	0,000129
Velocidade de agitação x Velocidade de agitação	-1,72437	0,097500	-17,6858	0,000011
Taxa de aeração x Velocidade de agitação	0,00750	0,115848	0,0647	0,950890
(B) Produção de biomassa [S = 0,1302961/R ² = 0,98814/R ² (adj)= 0,97628]				
Média/Interação	6,47667	0,208404	31,0775	0,000001
Taxa de aeração	0,33093	0,127621	2,5930	0,048658
Taxa de aeração x Taxa de aeração	-2,17896	0,151899	-14,3448	0,000030
Velocidade de agitação	1,10312	0,127621	8,6437	0,000342
Velocidade de agitação x Velocidade de agitação	-2,28896	0,151899	-15,0690	0,000023
Taxa de aeração x Velocidade de agitação	0,13750	0,180483	0,7618	0,480524

S = Erro padrão; R² = coeficiente de determinação; R²(adj) = coeficiente de determinação ajustado

A análise de variância é mostrada na Tabela 27. Os dados sugerem que o modelo de segunda ordem é apropriado, e que os efeitos linear e quadrático são significativos ($p < 0,05$). Além disso, não há nenhuma evidência da falta de ajuste, porque os valores de p são 0,0818 e 0,0723 ($> 0,05$) para as produções de PHAs e de biomassa, respectivamente.

Estes resultados mostram ainda que, os modelos escolhidos podem explicar satisfatoriamente os efeitos da taxa de aeração (X_1) e velocidade de agitação (X_2) sobre as produções de PHAs e de biomassa. Os modelos que se enquadram nas variáveis de resposta acima são compostos de valores não codificados (valores reais). As equações finais para Y_1 e Y_2 , derivadas da aplicação do método são apresentados nas equações 10 e 11, respectivamente. O conjunto de equações canônicas (\hat{Y}_1 e \hat{Y}_2) são apresentados nas equações 12 e 13. As variáveis W_1 e W_2 representam X_1 e X_2 , respectivamente, em formas canônicas.

Tabela 27: Análise de variância (ANOVA) para a produção de PHAs (A) e biomassa (B) usando valores codificados.

	GL	SS	MS	F	P
(A) Produção de PHAs					
Regressão	5	30,79886	30,79886	2132,034	0,0967
Erro Residual	5	0,26841	0,0909	5,141	0,0818
Falta de ajuste	3	0,25981	0,08660	5,141	
Erro puro	2	0,00860	0,00430		
Total	10	31,06727	30,88976		
(B) Produção de Biomassa					
Regressão	5	54,28914	54,28914	2478,857	0,0884
Erro Residual	5	0,65148	0,21963	5,589	0,0723
Falta de ajuste	3	0,63661	0,21220	5,589	
Erro puro	2	0,01487	0,00743		
Total	10	54,94062	54,06951		

Para produção de PHAs (Y_1):

$$Y_1 = 4.91 + 0.23848 X_1 - 1.60938 X_1^2 + 0.86907 X_2 - 1.72437 X_2^2 + 0.0075 X_1X_2 \quad (\text{Eq. 10})$$

$$\hat{Y}_1 = 4.895 - 1.2291W_1^2 - 1.725W_2^2 \quad (\text{Eq. 12})$$

Para produção de biomassa (Y_2):

$$Y_2 = 6.47667 + 0.33093 X_1 - 2.17896 X_1^2 + 1.10312 X_2 - 2.28896 X_2^2 + 0.1375 X_1X_2 \quad (\text{Eq. 11})$$

$$\hat{Y}_2 = 6.489 - 2.237W_1^2 - 2.164W_2^2 \quad (\text{Eq. 13})$$

Pode-se utilizar quaisquer valores para os dois fatores (taxa de aeração e velocidade de agitação) e estimar as quantidades produzidas de PHAs e de biomassa. Estas equações

têm um significado matemático (derivadas do planejamento estatístico) e não um significado fisiológico (fazer estimativas a partir de uma quantidade de microrganismo).

Os sinais negativos para as raízes λ_1 (-1,2291 e -1,725) e λ_2 (-2,237 e -2,164), obtidos a partir das equações canônicas (\hat{Y}_1 e \hat{Y}_2) mostram que as respostas Y_1 e Y_2 têm um ponto máximo.

A partir das equações canônicas, Y_1 (4,98 g.L⁻¹) pode-se obter os valores maximizados da taxa de aeração (1,0373 vvm) e da velocidade de agitação (502,0396 rpm). Y_2 (6,57 g.L⁻¹) foi maximizada utilizando 1,0112 vvm de taxa de aeração e 500,956 rpm da velocidade de agitação. Este resultado está de acordo com os apresentados na Tabela 25, no qual a produção máxima foi obtida no ponto central (1 vvm e 500 rpm, para taxa de aeração e velocidade de agitação, respectivamente).

13.2 Influência da taxa de aeração e da velocidade de agitação na produção de PHAs (Resposta Y_1)

As magnitudes dos coeficientes da Tabela 26 mostram que a velocidade de agitação (linear) tem maior influência na produção de PHAs do que a taxa de aeração (cerca de quatro vezes). Por outro lado, a taxa de aeração e a velocidade de agitação tem um efeito quadrático negativo (a magnitude do efeito da taxa de aeração é semelhante ao efeito da velocidade de agitação), e a interação entre a taxa de aeração e a velocidade de agitação tem um efeito positivo, mas tem baixa influência em comparação com os outros efeitos.

A Figura 36 que apresenta a superfície de resposta para a produção de PHAs em diferentes taxas de aeração/velocidades de agitação, mostra que a taxa de aeração afeta significativamente a produção de PHAs. Aumentando os valores da taxa de aeração para o ponto central, ocorre um aumento na produção de PHAs (4,98 g.L⁻¹). De acordo com a Tabela 25, a produção de PHAs foi maximizada a 1 vvm de taxa de aeração e 500 rpm de velocidade de agitação, para uma relação C: N de 0,6 no meio fermentativo. A produção de PHAs foi mínima (0,20 g.L⁻¹), em 0,5 vvm e 250 rpm. A baixa velocidade de agitação também afetou significativamente a produção de PHAs (Figura 36).

Baixas e altas taxas de aeração e velocidade agitação resultaram em uma menor produção de PHAs. Isto pode ser atribuído ao fato da limitação de oxigênio no sistema fermentativo, baixas taxas de aeração e velocidades de agitação, diminuem a concentração de

oxigênio no biorreator, enquanto que elevada taxa de aeração combinada com elevada velocidade de agitação pode causar o estresse celular. A chave deste controle está relacionado ao destino do acetil-CoA, que pode ser oxidado através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) ou pode servir como um substrato para a produção de PHAs. Na limitação de oxigênio, quando aumenta a relação NADH/NAD, as enzimas citrato-sintase e isocitrato desidrogenase são inibidas por NADH e, em consequência, o acetil-CoA não entra no ciclo do TCA com a mesma taxa e é convertido a acetoacetylCoAby3-cetotiolase (a primeira enzima para produção de PHAs) que é inibida por CoA (Anderson e Dawes, 1990).

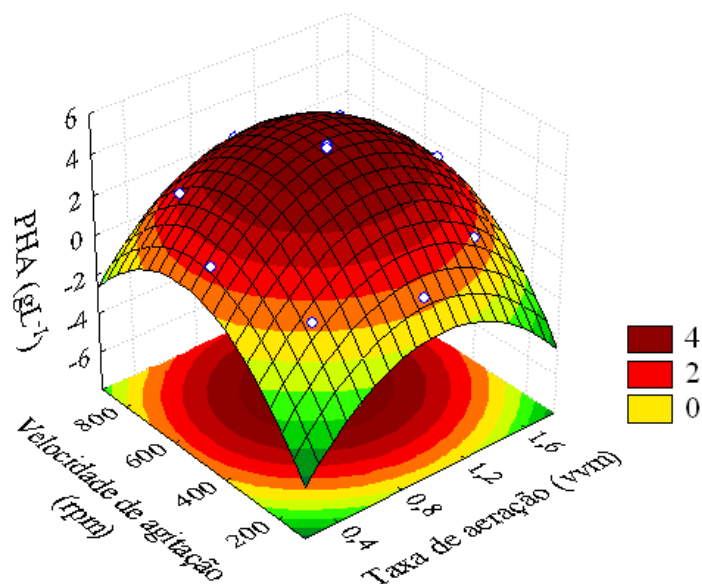


Figura 36: Efeito da taxa de aeração/velocidade de agitação na produção de PHAs em biorreator (35°C/72h).

Dobroth et al. (2011), utilizando um mix de microrganismos consorciados, em biorreator (500 rpm, 1 vvm, pH 7, 30°C, 120h), obtiveram 1,0 g.L⁻¹ de PHAs a partir da GBRB. Cavalheiro et al. (2009), conseguiram melhores valores de produção de PHAs (4,2 g.L⁻¹) com a GBRB e *Cupriavidus necator* em biorreator (1500 rpm, 3,6 vvm, pH 6,8, 34°C, 26h). Porém, Andrezben et al. (2010), produziram 0,27 g.L⁻¹ de biopolímero a partir de *Escherichia coli* em biorreator nas seguintes condições, 400 rpm, 2,5 vvm, com pH 6,7, a 37°C por 92h. Estes resultados indicam o quanto a produção de PHAs é dependente das condições de fermentação e do microrganismo utilizado. Thipathi et al. (2013), estudaram a produção de PHB em biorreator a partir do bagaço de cana (taxa de aeração mantida a 30% de saturação e velocidade de agitação entre 200 a 1000 rpm), e relatam que o aumento da

velocidade de agitação diminuiu o acúmulo de PHB, obtendo máxima produção de PHB (8,58 g.L⁻¹) após 48h de fermentação com velocidade de agitação também de 500 rpm.

13.3 Influência da taxa de aeração e da velocidade de agitação na produção de biomassa (Resposta Y₂)

As magnitudes dos coeficientes (Tabela 26) mostram que a velocidade de agitação linear exerce mais influência na produção de biomassa do que a taxa de aeração (cerca de três vezes), mas a taxa de aeração e a velocidade de agitação (quadráticas), apresentam magnitudes semelhantes. No entanto, o coeficiente de interação taxa de aeração/velocidade de agitação tem efeito positivo, porém, menor do que os outros, em valores absolutos. A Figura 37 que apresenta a superfície de resposta da produção de biomassa em diferentes taxas de aeração/velocidades de agitação, mostra que a produção de biomassa é maximizada a 1 vvm de taxa de aeração e 500 rpm de velocidade de agitação, e as outras taxas e velocidades resultaram em menores produções de biomassa.

A máxima quantidade de biomassa produzida (6,57 g.L⁻¹) foi obtida no experimento 9 (Tabela 25), com 1 vvm de taxa de aeração e 500 rpm de velocidade de agitação. O valor mínimo de biomassa produzida (0,23 g.L⁻¹) foi obtido no experiment 1 (Tabela 25), com 0,5 vvm de taxa de aeração e 250 rpm de velocidade de agitação.

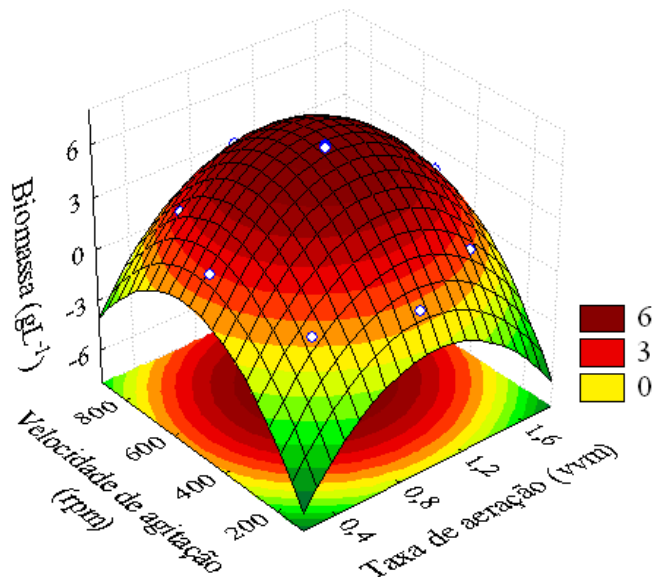


Figura 37: Efeito da taxa de aeração/velocidade de agitação na produção de biomassa em biorreator (35°C/72h).

Cavalheiro et al. (2012) relataram uma concentração máxima de células ($82,5 \text{ g.L}^{-1}$) após 33,5 h de fermentação de GBRB por *Cupriavidus Necator* em biorreator ($34^\circ\text{C}/48\text{h}/2\text{vvm}$) e Zhu et al. (2010), 5 g.L^{-1} com o mesmo substrato por *Burkholderia cepacia* em biorreator de 400 L.

Sangkharak e Prasertsan (2007), testaram diferentes taxas de aeração (0, 0,5, 1,0 e 2,0 vvm) na produção de PHAs e biomassa e concluíram que a produção de células e de biopolímero aumentam com a taxa de aeração. Obtiveram um acúmulo máximo de 89,9% a 1 vvm para o microrganismo *Rhodobacter sphaeroides* N20. O acúmulo celular máximo foi de 92,18% (experimento 2), obtido nas seguintes condições: 0,5 vvm de taxa de aeração e 750 rpm de velocidade de agitação com o microrganismo *Cupriavidus necator* IPT 026. Todos os valores de acúmulo celular foram maiores quando comparado às produções em agitador orbital, o que indica uma maior eficiência etapa de limitação de nitrogênio, onde ocorre basicamente toda conversão de substrato a biopolímero.

13.4 Verificação do modelo

A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para otimizar a taxa de aeração e a velocidade de agitação com o intuito de obter maior quantidade de PHAs, revelando o efeito da interação dessas variáveis físicas na síntese de grânulos intracelulares.

A verificação do modelo proposto foi realizada através da condução de experimentos em triplicata, sob a condição otimizada em biorreator. Obteve-se produção de $4,94 \text{ g.L}^{-1}$ de PHAs e o valor previsto pelo modelo foi de $4,91 \text{ g.L}^{-1}$. Os resultados podem ser observado na Tabela 28, que mostra a coerência entre a quantidade de PHAs produzida experimentalmente e a quantidade de PHAs estimada pelo modelo teórico.

Tabela 28: Produção de PHAs antes e após a otimização.

Variáveis	Valores do planejamento estatístico	Valores otimizados	Produção de PHAs (g.L^{-1})		
			Antes	Após	
				Predição	Experimental

Taxa de aeração (vvm)	1	1,04	4,98	4,91	4,94
Velocidade de agitação (rpm)	500	502			

13.5 Parâmetros cinéticos nas condições otimizadas em biorreator

É importante estabelecer a cinética de crescimento num biorreator de 4,5 L sob condições ambientais controladas, pois a determinação dos parâmetros cinéticos básicos, ajudam a formular uma proposta do modelo matemático, que pode então ser utilizado para o planejamento da operação e a concepção de uma estratégia para o ótimo funcionamento do biorreator na obtenção de produtos de interesse, neste estudo os PHAs. A Figura 38 mostra o curso do tempo de cultivo de *Cupriavidus necator* IPT 026 para a produção de PHAs, de biomassa e consumo de GBRB em biorreator (condições do ponto central, Tabela 25). Observou-se que a fase lag foi significativamente minimizada no biorreator por meio da inoculação da cultura ativa de *Cupriavidus necator* IPT 026 desenvolvida em agitador orbital e a manutenção das condições ambientais constantes. A partir da Figura 38, pode ser constatado que a síntese de PHAs foi iniciada imediatamente após a fase lag (após 12 h), uma vez que o acúmulo de PHAs está associado ao crescimento de *Cupriavidus necator*. Depois de 72 h de cultura, a biomassa e a concentração de PHAs atingiram um valor máximo de 6,49 e 4,93 g L⁻¹, respectivamente, e 9,06 g.L⁻¹ de GBRB foram metabolizados considerando o valor inicial de 12,02 g.L⁻¹, com apenas 2,96 g.L⁻¹ não consumida (Tabela 29).

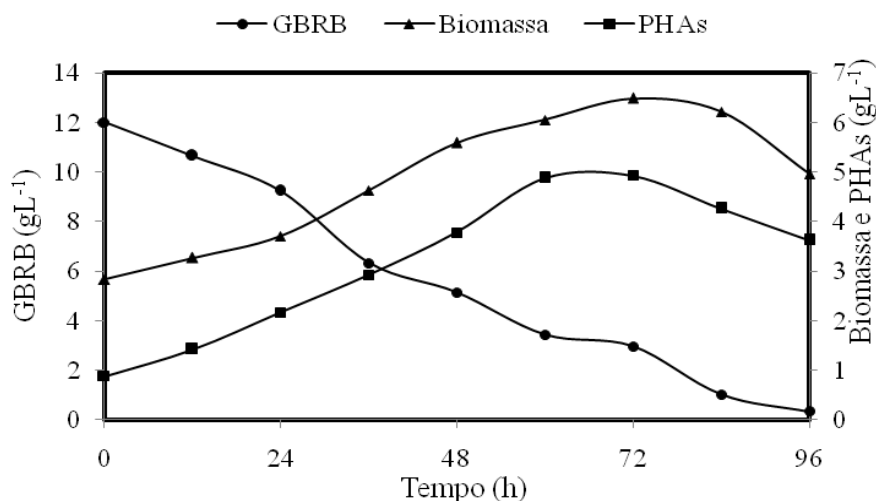


Figura 38: Acompanhamento do consumo de substrato e formação de biomassa e produto ao longo de 96 horas de fermentação de GBRB em biorreator de 4,5L (35°C, 72 horas, pH 7,0, 1 vvm, 500 rpm) por *Cupriavidus necator* IPT 026.

A Tabela 29 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos do processo de fermentação obtidos a partir da produção de PHAs em biorreator. A velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) de *Cupriavidus necator* foi calculada a partir da correlação gráfica entre μ e S, encontrando-se $0,05 \text{ h}^{-1}$, que sugere baixo crescimento celular e consumo do substrato. Produções realizadas a 35°C, por FARIAS (2009) apresentou valores de μ_{\max} de $0,1907 \text{ h}^{-1}$.

Tabela 29: Parâmetros cinéticos obtidos ao longo de 96h de fermentação de GBRB por *Cupriavidus necator* nas condições otimizadas de taxa de aeração e velocidade de agitação em biorreator (1,0 vvm, 500 rpm, 3,0 L de volume útil).

Parâmetros	Tempo de fermentação								
	inicial	12	24	36	48	60	72	84	96
S (g.L ⁻¹)	12,02	10,65	9,23	6,32	5,15	3,43	2,96	1,02	0,34
X (g.L ⁻¹)	2,83	3,27	3,71	4,63	5,59	6,05	6,49	6,22	4,96
P (g.L ⁻¹)	0,88	1,42	2,17	2,93	3,78	4,88	4,93	4,26	3,62
Y _{x/s}	0,00	0,32	0,32	0,32	0,40	0,37	0,40	0,31	0,18
Y _{x/p}	0,00	0,81	0,68	0,88	0,95	0,81	0,90	1,00	0,78
Y _{p/s}	0,00	0,39	0,46	0,36	0,42	0,47	0,45	0,31	0,23
r _s (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,00	0,11	0,12	0,16	0,14	0,14	0,13	0,13	0,12
r _x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,00	0,04	0,04	0,05	0,06	0,05	0,05	0,04	0,02
r _p (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,00	0,05	0,05	0,06	0,06	0,07	0,06	0,04	0,03
μ_s (h ⁻¹)	0,01	0,01	0,03	0,02	0,03	0,01	0,05	0,06	-0,01
μ_x (h ⁻¹)	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,00	-0,02	0,01
μ_p (h ⁻¹)	0,05	0,04	0,03	0,02	0,02	0,00	-0,01	-0,01	0,01

X = Biomassa; S = Substrato; P = Produto; YX/S= Fator de conversão substrato-biomassa; YX/P = Fator de conversão produto-biomassa; YP/S = Fator de conversão substrato-produto; rS= Velocidade instantânea de consumo de substrato; rX = Velocidade instantânea de formação de biomassa, rP = Velocidade instantânea de formação de produto; μ_X = velocidade específica de formação de biomassa; μ_S = velocidade específica de consumo de substrato.

Pode-se observar na Tabela 29 que no tempo de fermentação de 72h, os valores de Y_{x/s}, Y_{x/p} e Y_{p/s}, foram 0,4, 0,9 e 0,45, respectivamente. Estes valores são superiores aos encontrados por Mothes et al. (2007) que utilizou o microrganismo *Cupriavidus necator* para

produzir PHAs a partir de GBRB e encontrou $Y_{p/s}$ igual a 0,32, e produção máxima de biopolímero de 3,12 g.L⁻¹. Cavalheiro et al. (2009), utilizando o mesmo microrganismo e substrato, encontraram $Y_{p/s}$ igual a 0,03 e $Y_{x/s}$ igual a 0,42, e 4,2 g.L⁻¹ e 13,5 g.L⁻¹, para as produções máximas de PHAs e de biomassa, respectivamente. Papanikolaou et al. (2008), utilizaram *Yarrowia lipolytica* para produzirem PHA a partir de GBRB, e obtiveram 0,5 g.L⁻¹ de PHAs, com $Y_{p/s}$ igual a 0,11 e μ_{max} de 0,36 h⁻¹. Ibrahim e Steinbuchel (2009), produziram PHAs a partir de GBRB com *Zobellella denitrificans*, e obtiveram μ_{max} de 0,35 h⁻¹ e $Y_{p/s}$ de 0,1, com uma produção máxima de 9,28 g.L⁻¹ do biopolímero.

13.6 Propriedades dos PHAs obtidos nos experimentos em biorreator

13.6.1 Infra-Vermelho com Transformada de Faurier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica valiosa para estudar os polímeros (incluindo poliésteres) e estimar interações, bem como alterações na morfologia dos componentes que combinam com as interações químicas e com a estrutura conformacional das moléculas.

A Figura 39 mostra os espectros de FTIR das amostras de PHAs produzida em biorreator. Os espectros dos PHAs são idênticos para todos os PHAs, portanto, apenas três espectros (experimento 3, 5 e 9) foram representados.

Duas bandas principais aparecem no espectro de PHA: uma de 1724 cm⁻¹ e outra em 1280 cm⁻¹, que correspondem a C = O e C-O, respectivamente (Hong et al., 1999; Rohini et al., 2006). Os picos relacionados com a deformação axial do grupo carbonila (C = O), em 1724 cm⁻¹, a vibração da carbonila do grupo éster (CC) à 978 cm⁻¹, a deformação angular no plano dos grupos simétricos (CH₃) à 1380 cm⁻¹ e (CO) em 1279 cm⁻¹ foram identificados nos PHAs produzidos a partir de GBRB, comprovando que poliésteres foram obtidos. Estes picos também foram encontrados por Galego (2000).

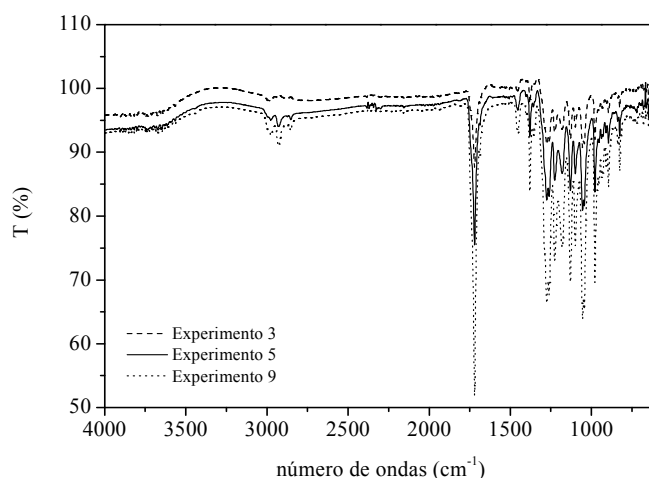


Figura 39: Espectros de FTIR obtido para PHAs produzidos a partir de GBRB.

13.6.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TG)

Os PHAs obtidos a partir do planejamento experimental foram analisados para avaliar as propriedades térmicas utilizando o parâmetro da temperatura de fusão, T_m (Figura 40, Tabela 30), que afeta significativamente as aplicações potenciais do polímero (Dobroth et al., 2011). Com base nos resultados de DSC, a T_m do PHA obtido no experimento 5 (195,2°C) foi o mais elevado, enquanto que o produzido no experimento 3 (161,3°C) foi o mais baixo, mostrando a influência da taxa de aeração e da velocidade de agitação do biorreator nas propriedades do biopolímero resultante. Os valores obtidos para a T_m para alguns PHAs obtidos a partir da GBRB coincidem com os valores relatados na literatura (174-183°C) para PHAs produzidos a partir de glicose (Anderson e Dawes, 1990; Gomez e Neto, 1997).

Almeida et al. (2007), utilizaram *Escherichia coli* para produzir PHAs em biorreator (1000 rpm, 1 vvm, pH 7,2, 37°C, 48h) e encontraram T_m de 169,8°C para o biopolímero. Mothes et al. (2007), a partir de GBRB e diferentes microrganismos, obtiveram T_m de 169°C e 173°C para os PHAs produzidos por *Paracoccus denitrificans* e *Cupriavidus necator*, respectivamente. Dobroth et al. (2011) produzindo PHAs a partir de GBRB em biorreator (500 rpm, 1 vvm, pH 7, 30°C, 120h) relatam T_m de 175°C.

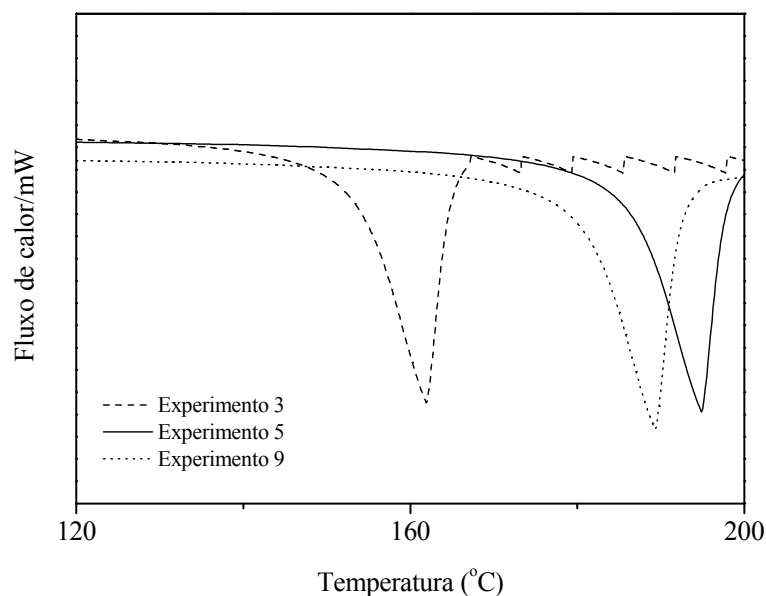


Figura 40: Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) dos PHAs obtidos a partir de GBRB por biorreator.

Tabela 30: Valores de T_m , $T_{on\ set}$, T_{decomp} , grau de cristalinidade e massa molar dos PHAs obtidos nos experimentos do planejamento experimental.

Experimento	T_m (°C)	$T_{on\ set}$ (°C)	T_{decomp} (°C)	Grau de cristalinidade (%)	MM (KDa)
1	173,4	298,1	325,6	60,49	710
2	168,7	293,6	328,5	58,18	820
3	161,3	265,4	295,2	68,42	630
4	170,5	308,3	331,6	55,36	740
5	195,2	325,8	350,1	46,97	920
6	166,8	281,4	311,4	56,22	870
7	175,3	312,9	335,8	50,61	780
8	178,1	320,6	345,0	54,34	830
9	189,7	316,2	336,7	51,12	850
10	189,1	314,1	340,2	50,84	860
11	188,9	318,3	338,3	51,35	860

A análise termogravimétrica foi realizada para fornecer informações relativas à estabilidade térmica dos polímeros obtidos nos experimentos do planejamento estatístico. De acordo com a Figura 41 e a Tabela 30, o PHA produzido no experimento 5 apresentou

degradação térmica entre 325,8°C ($T_{on\ set}$) e 359,1°C, com um pico a 350,1°C (T_{decomp}). A perda total de massa dentro desta temperatura foi de 94,7%. Para o PHA obtido no experimento 3, a degradação térmica ocorreu entre 265,4°C ($T_{on\ set}$) e 310,2°C e apresentou um pico a 295,2,4°C (T_{decomp}). A perda total de massa foi de 93,4%. A elevada perda de massa indica baixas quantidades de matéria inorgânica no biopolímero. Zhu et al. (2009) produziram PHAs utilizando a cepa *Burkholderia cepacia* a partir da GBRB em agitador orbital (150 rpm, pH 7,0, 30°C, 96h) e obtiveram T_{decomp} no valor de 281,5°C. Garcia et al. (2013) obtiveram T_{decom} de 271°C, para PHAs obtidos a partir da GBRB com *Cupriavidus necator* em agitador orbital (250 rpm, pH 7, 30°C, 120h).

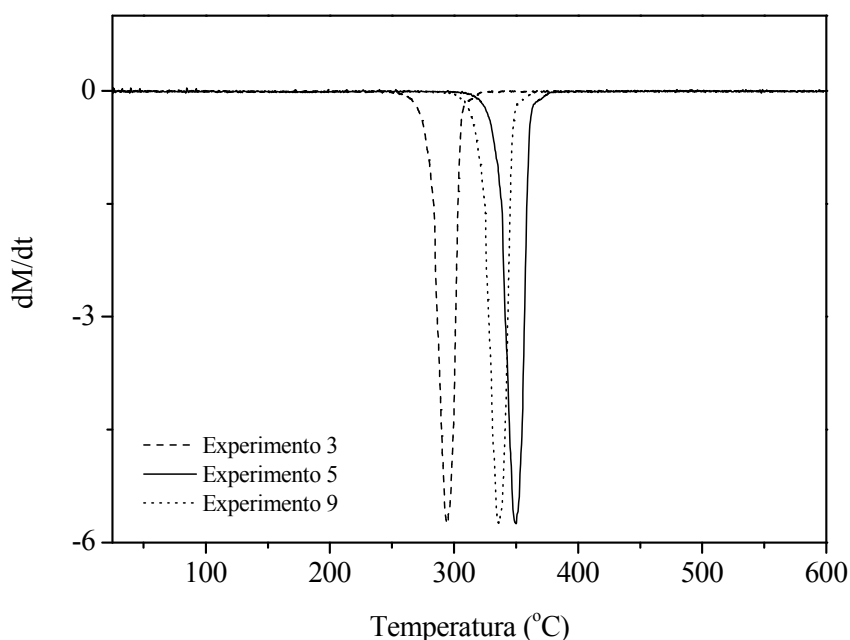


Figura 41: Análise termogravimétrica de PHAs obtidos a partir de GBRB.

Pode-se verificar que o aumento da velocidade de agitação nos experimentos provocou um aumento na T_{decomp} para os PHAs obtidos em biorreator, efeito não foi constatado para a taxa de aeração.

13.6.3 Difração de raio-X (DRX)

A cristalinidade de PHAs obtidos a partir de GBRB (Tabela 25) foi avaliada (Figura 42, Tabela 30). Com base nos resultados de DRX, o grau de cristalinidade dos PHAs produzidos variou de 46,97% a 68,42%, mostrando a grande influência da velocidade de agitação e taxa de aeração do biorreator. O grau de cristalinidade obtido para os PHAs neste estudo foi melhor do que os relatados por Bengtsson et al. (2010) e Lee (1996) (58% e 65%, respectivamente). Um baixo grau de cristalinidade aumenta o número de possíveis aplicações industriais de PHAs, melhorando as suas características de processamento.

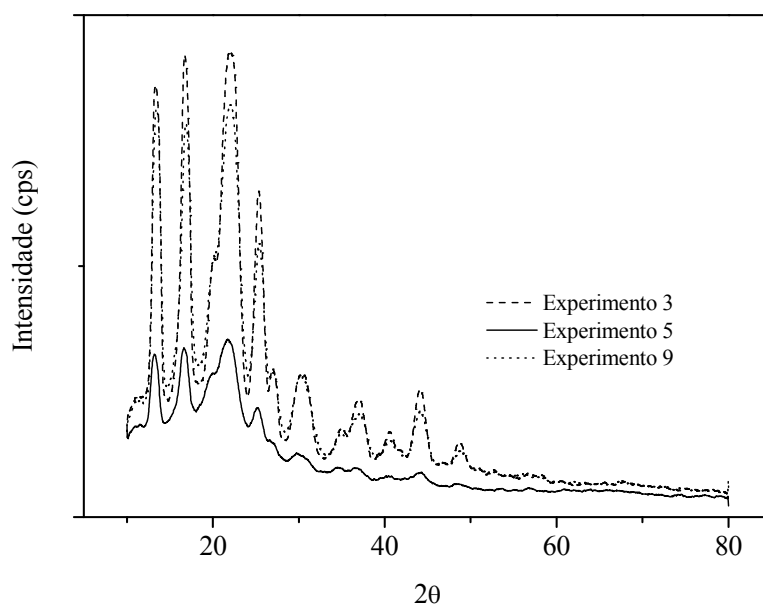


Figura 42: Análise de DRX para os PHAs obtidos a partir da GBRB.

Almeida et al. (2007), utilizaram *Escherichia coli* para produzirem PHAs em biorreator (1000 rpm, 1 vvm, pH 7,2, 37°C, 48h) e encontraram grau de cristalinidade de 52,6% para o biopolímero. Dobroth et al. (2011) produzindo PHAs a partir de GBRB em biorreator (500 rpm, 1 vvm, pH 7, 30°C, 120h) obtiveram grau de cristalinidade de 65%.

13.6.4 Massa molar (MM)

A Figura 43 apresenta os cromatogramas obtidos por CLAE-IR dos PHAs produzidos em biorreator (Tabela 25). A massa molar dos diferentes PHAs foi dependente da velocidade

de agitação no meio fermentativo. Os PHAs produzidos nos experimentos 3, 5 e 9 apresentaram massas molares de 630 kDa, 920 kDa e 850 kDa, respectivamente (Tabela 30).

Sabe-se que a velocidade de agitação no vaso do biorreator permite melhor e maior transferência de massa, possibilitando maior polimerização das cadeias monoméricas. Assim, diferentes velocidades de agitação podem originar polímeros com diferentes comprimentos de cadeia.

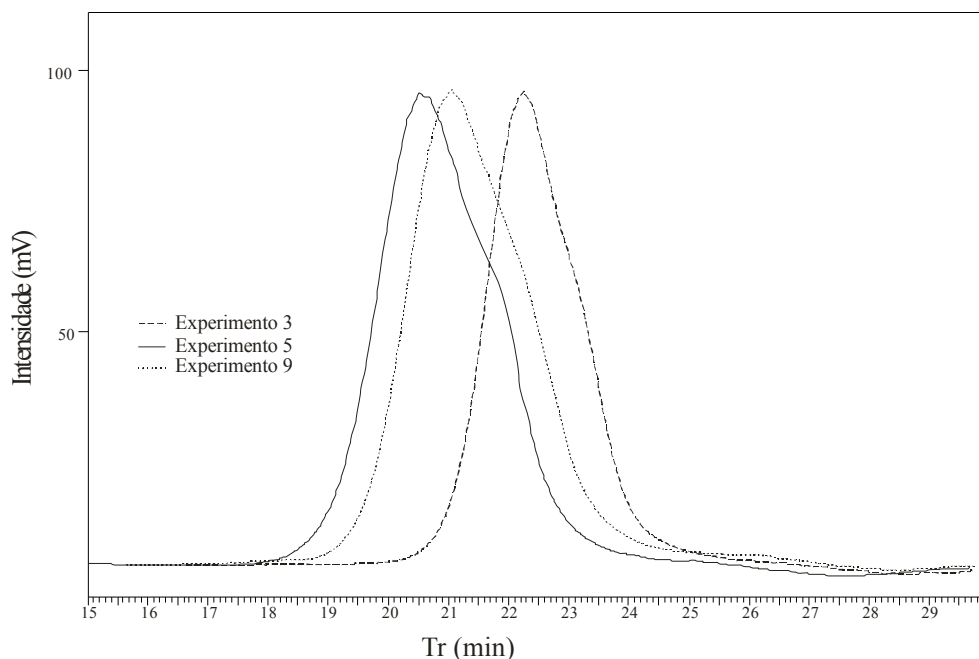


Figura 43: Cromatogramas CLAE-IR dos PHAs obtidos a partir da GBRB.

O valor da MM determinada no experimento 5, foi superior ao obtido por Mothes et al. (2007), Cavalheiro et al. (2012), Andrezben et al. (2010), Ashby et al. (2004, 2011), Gozke et al. (2012), porém foi inferior ao encontrado por Cavalheiro et al. (2009).

Mesmo que a composição química da unidade repetidora do biopolímero seja a mesma, diferentes massas molares podem alterar significativamente as propriedades dos PHAs, justificando as diferenças obtidas (Tabela 30). Portanto, a massa molar do biopolímero é determinada pelas condições de operação de produção, e diferentes condições de operação produzem polímeros com diferentes massas molares.

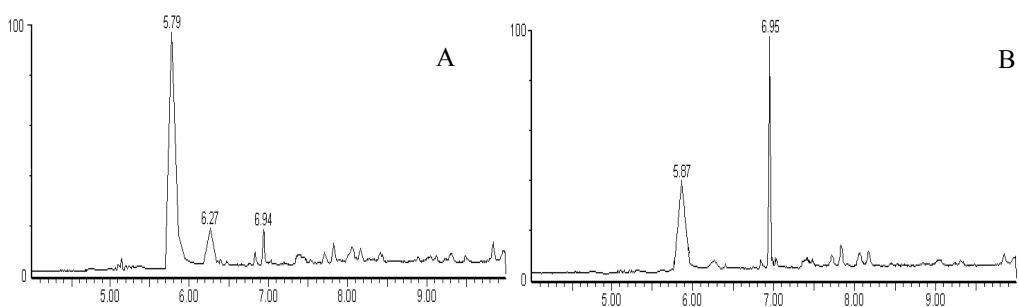
Devido à concorrência industrial, a capacidade de controlar a massa molar do biopolímero durante a produção e a compreensão de como a massa molar influencia as propriedades finais do polímero são extremamente importantes.

Esta diferença de comportamento observada para os diferentes biopolímeros obtidos neste estudo, pode provavelmente ser atribuída a um rearranjo estrutural do polímero durante a biossíntese. Este rearranjo estrutural pode ter sido causada por um aumento no grau de polimerização, o qual formado com cadeias mais longas, apresentou maiores massas molares e, conseqüentemente, o material apresentou maior estabilidade sob aquecimento.

13.6.5 Composição monomérica

A Figura 44 mostra os cromatogramas obtidos por GC-MS das amostras de PHAs produzidos no experimento 3 (baixas propriedades), 5 (melhores propriedades) e experimento 9 (propriedades intermediárias). As amostras de PHAs produzidos consistem principalmente do monômero 3-hidroxibutirato (3HB), indicado pelo tempo de retenção de 5.79'. A Tabela 31 mostra que mais de um monômero está presente nas amostras de PHAs produzidos neste estudo. É muito importante para a composição do PHA obtido a partir da GBRB apresentar variedade de monômeros, pois as propriedades do biopolímero depende do tipo de cadeia que estão presente em sua estrutura.

O monômero 3-hidroxipentanoato (6,27'), também foi identificado nas amostras, o pico presente em 7,38' foi identificado como monômero de 8-hidroxinonanoato e o pico presente em 6,95' foi identificado como monômero de 3-hidroxiheptanoato pela biblioteca da NIST. Cavalheiro et al. (2009), produziram PHAs a partir da GBRB com *Cupriavidus necator* em biorreator (1500 rpm, 3,6 vvm, pH 6,8, 34°C, 26h) e obtiveram 22% do monômero 4hidroxibutirato. Andrezen et al. (2010), produzindo PHAs a partir da GBRB utilizando *Escherichia coli* em biorreator (400 rpm, 2,5 vvm, pH 6,7, 37°C, 92h) obtiveram biopolímero com 42% de 4-hidroxipentanoato.



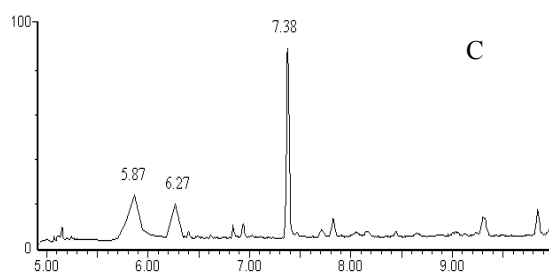


Figura 44: Cromatogramas GC/MS: (A) PHA experimento 3; (B) PHA experimento 5 e (C) PHA experimento 9.

Tabela 31: Perfil monomérico de PHAs produzidos em biorreator por *Cupriavidus necator* IPT 026 e GBRB.

Tempo de retenção (min)	Monômero	PHA experimento 3	PHA experimento 5	PHA experimento 9
5,79	3-hidroxibutirato (%)	72,34	43,56	28,08
6,27	3-hidroxipentanoato (%)	10,72	---	23,58
6,95	3-hidroheptanoato (%)	3,56	42,23	---
7,38	8-hidroxinonanoato (%)	---	---	38,22
---	Outros não identificados (%)	13,38	14,21	10,12

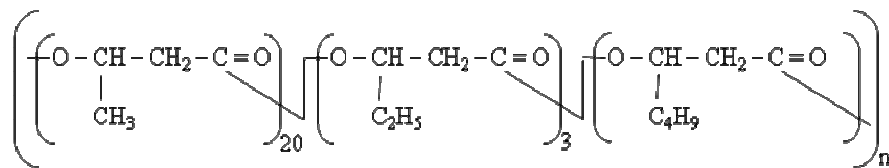
Os resultados apresentados na Tabela 31 demonstram que as composições monoméricas de PHAs obtidos em diferentes condições de taxa de aeração e velocidades de agitação são diferentes e as variações no comprimento e composição química dos biopolímeros determinam a variedade de PHAs e suas diversas aplicações, assim como as diferenças nas propriedades térmicas e de cristalinidade (Tabela 30). Não houve correlação entre a taxa de aeração e a velocidade de agitação e a composição monomérica dos biopolímeros produzidos.

A Figura 45 mostra uma possível representação esquemática da composição química dos PHAs produzidos por *Cupriavidus necator* IPT 026 a partir da fermentação de GBRB em biorreator, nas condições dos Experimentos 1 (0,5 vvm e 250 rpm), 5 (0,3 vvm e 500 rpm), e 9 (1 vvm e 500 rpm). Ressalta-se mais uma vez que não foi determinada a ordem sequencial de hidróxi ésteres que compõem as unidades repetidoras da estrutura de cada polímero.

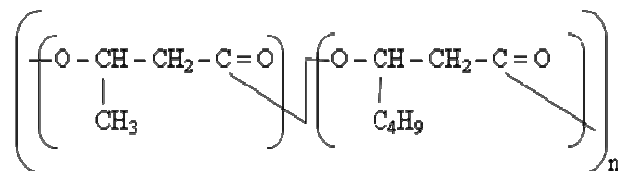
Pela Figura 45 pode-se constatar que independente das condições de agitação e aeração do sistema de cultivo da GBRB em biorreator, o PHA resultante é composto por

hidróxi ésteres contendo 4C em diferentes proporções como parte do polímero. Na condição 1 (0,5 vvm e 250 rpm) o polímero é composto praticamente deste éster, entretanto nas condições dos experimentos 5 (0,3 vvm e 500 rpm), e 9 (1 vvm e 500 rpm) foram inseridos no polímero outros hidróxi ésteres, contendo portanto proporções elevadas de moléculas contendo 7C ou 5C e 9C nas unidades do polímero, respectivamente. A medida que aumenta a aeração ou a agitação, aumenta o percentual de algum dos monômeros.

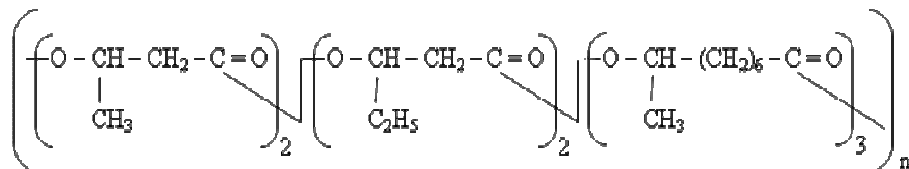
Estas diferenças nas composições dos PHAs justificam as diferentes propriedades obtidas na Tabela 30.



PHA Experimento 1: Poli-3-hidroxi butirato-CO-3-hidroxi pentanoato-CO-3-hidroxi heptanoato



PHA Experimento 5: Poli-3-hidroxi butirato-CO-3-hidroxi heptanoato



PHA Experimento 9: Poli-3-hidroxi butirato-CO-3-hidroxi pentanoato-CO-8-hidroxi nonanoato

Figura 45. Representação esquemática de uma possível composição química dos PHAs produzidos por *Cupriavidus necator* IPT 026 a partir da fermentação de GBRB em biorreator, nas condições dos Experimentos 1 (0,5 vvm e 250 rpm), 5 (0,3 vvm e 500 rpm), e 9 (1 vvm e 500 rpm).

13.7 Conclusões parciais

As máximas produções de PHAs e de biomassa (4,98g.L⁻¹ e 6,57 g.L⁻¹, respectivamente) em biorreator por fermentação de GBRB (15 g.L⁻¹) com *Cupriavidus*

necator IPT 026, ocorreram no ponto central do experimento (1 vvm de taxa de aeração e 500 rpm de velocidade de agitação).

O aumento da taxa de aeração e da velocidade de agitação, resultou no aumento das produções de biomassa e de PHAs, e esses dois fatores afetaram de forma significativa a produção de PHAs. A produção de PHA variou de 0,20 g.L⁻¹ a 4,98 g.L⁻¹ dependendo da condição da aeração e rotação no biorreator

A taxa de aeração e a velocidade de agitação otimizadas que resultaram na máxima produção de PHAs foram de 1,0373 vvm e 502,0396 rpm, respectivamente.

O modelo otimizado foi verificado e os resultados mostraram coerência entre a quantidade de PHAs produzido (experimental) e a quantidade de PHAs estimado pelo modelo (teórico).

Os parâmetros cinéticos foram determinados e os valores encontrados foram superiores aos valores citados na literatura.

O PHA obtido no ponto central (experimento 9), apresentou T_m de 189,7°C, grau de cristalinidade de 51,12%, temperatura de degradação entre 316,2°C e 349,3°C com pico a 336,7°C, massa molar de 850 kDa e os monômeros, 3- hidroxibutirato (3HB), 3- hidroxipentanoato e 8-hidroxinonanoato.

A taxa de aeração e velocidade de agitação exerceu grande influência na massa molar e composição química dos biopolímeros, justificando as diferenças nas propriedades térmicas e de cristalinidade dos mesmos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A glicerina bruta residual do biodiesel (GBRB) é um substrato rico em nutrientes para a produção de PHAs e pode ser utilizado pelos microrganismos *Cupriavidus necator* IPT 026, 027 e 028, mesmo apresentando quantidades significativas de sais de sódio.

Entre as cepas testadas, *Cupriavidus necator* IPT 026 foi a que mais acumulou PHAs a partir da fermentação de GBRB nas condições de 15 g.L⁻¹ de substrato, 10 g.L⁻¹ de nitrogênio a 35°C, por 72 h em agitador orbital (250 mL, 180 rpm) atingindo 2,81 g.L⁻¹, e nestas condições com 1 vvm de taxa de aeração e 500 rpm em biorreator (4,5 L), 4,98 g.L⁻¹. Portanto, os aumentos de volume, de aeração e de agitação resultaram em aumento de 77 % na produção do biopolímero.

O método que resultou em maior extração do poliéster das células de *Cupriavidus necator* foi o que emprega liofilização das células com agitação por 2 h em clorofórmio (1:50 v/v), e passagem do material filtrado para placa com secagem em estufa por 24 h.

Na condição otimizada do processo em biorreator, os fatores de conversão $Y_{x/s}$, $Y_{x/p}$ e $Y_{p/s}$, foram 0,4, 0,9 e 0,45, respectivamente.

A variação das concentrações de GBRB e de nitrogênio, da taxa de aeração e velocidade de agitação exercem grande influência na massa molar (510 a 920 kDa) e composição química dos poliésteres com diferentes teores de hidróxiésteres com 4C, 5C, 7C 9C dependendo da condição de cultivo, justificando as diferenças nas propriedades térmicas e de cristalinidade dos mesmos. Na condição otimizada em bioreator, o PHA composto de 28% de 3-hidroxi-butirato, 23% de 3-hidroxi-pentanoato e 38% de 8-hidroxi-nonanoato apresenta T_m de 189,7°C, MM 850 kDa, cristalinidade de 51,12%. Entretanto, as diversificadas propriedades dos PHAs obtidos em diferentes condições de aeração e agitação do cultivo submerso em biorreator possibilitam biopolímeros com diferentes propriedades, que podem ter diferentes aplicações.

Portanto, a produção de PHAs a partir da GBRB é uma alternativa de agregação de valor ao resíduo, aliada a diminuindo os custos de produção do biopolímero.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIPLAST. Associação Brasileira da Indústria do Plástico. **Informativo 2010**. Disponível em: <<http://www.abiplast.org.br>>. Acesso em: 22 fev. 2013.

ALBARELLI, J. Q.; SANTOS, D. T.; HOLANDA, M. R. Energetic and economic evaluation of waste glycerol cogeneration in Brazil. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 04, p. 691-698, 2011.

ALMEIDA, A.; RUIZ, J. A.; LÓPEZ, N. I.; PETTINARI, M. J. Bioplásticos: uma alternativa ecológica. **Química Viva**, v. 3, n. 3, p. 122-133, 2004.

ALMEIDA, A.; NIKEL, P. I.; GIORDANO, A. M.; PETTINARI, M. J. Effects of granule-associated protein phap on glycerol-dependent growth and polymer production in poly(3-hydroxybutyrate)-producing *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 7912 – 7916, 2007.

AMPE, F. **Métabolism du benzoate chez *Alcaligenes eutrophus*: quels mécanismes physiologiques régulent la biodégradation des composés aromatiques**. 1995. 237 p. Tese (Doutorado). L'institut National des Sciences appliquees de Toulouse, Toulouse.

ANAND, P.; SAXENA, R. K. A comparative study of solvent-assisted pretreatment of biodiesel derived crude glycerol on growth and 1,3-propanediol production from *Citrobacter freundii*. **New Biotechnology**, v.29 , n.2 , p. 1-7. 2011.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiological Reviews**, v. 54, n. 4, p. 450-472, 1990.

ANDRE, A.; DIAMANTOPOULOU, P.; PHILIPPOUSSIS, A.; SARRIS, D.; KOMAITIS, M.; PAPANIKOLAOU,S. Biotechnological conversions of bio-diesel

derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. **Industrial Crops and Products**, v.31, n.2, p. 407-416, 2010.

ANDREEBEN, B.; LANGE, A. B.; ROBENEK, H.; STEINBUCHER, A. Conversion of Glycerol to Poly(3-Hydroxypropionate) in Recombinant *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 622–626, 2010.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis of AOAC International**. 16th ed., Horwitz, W., Maryland: Gaithersburg, 1997.

ARAGÃO, G. M. F. **Production de polyhydroxyalcanoates par *Alcaligenes eutrophus*: caractérisation cinétique et contribution à l'optimisation de la mise en oeuvre des cultures**. 1996. 162p. Tese (Doutorado). L'institut National des Sciences appliquées de Toulouse, Toulouse.

ASHBY R. D.; SOLAIMAN D. K. Y.; FOGLIA T. A. Bacterial Poly(hydroxyalcanoate) polymer production from the biodiesel co-product stream, **Journal Polymer Environmental**, v. 12, p. 105–112, 2004.

ASHBY, R. D.; SOLAIMAN, D. K. Y.; STRAHAN, G. D. Efficient Utilization of Crude Glycerol as Fermentation Substrate in the Synthesis of Poly(3-hydroxybutyrate) Biopolymers. **Journal American Oil Chemical Society**, v. 88, p. 949–959, 2011.

ATLIĆA.; KOLLER M.; SCHERZER D.; KUTSCHERA C.; GRILLO-FERNANDES E.; HORVAT P.; CHIellini E.; BRAUNEGG G. Continuous production of P3HB by *Cupriavidus necator* in a multistage bioreactor cascade. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, p. 295-304, 2011.

AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. **O Agronegócio da Mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2001.

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.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911- 917, 1959.

BLUHM, L.; HAMER, G.; MARCHESSAULT, H. Isodimorphism in Bacterial Poly(-3-hydroxybutyrate, co- hydroxyvalerate). **Macromolecules**, v. 19, p. 2871-287, 1986.

BOSCO, F.; CHIAMPO, F. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) using milk whey and dairy wastewater activated sludge production of bioplastics using dairy residues. **Journal Bioscience Bioengineer**, v.109, p.418-421, 2010.

BRANDÃO, L. V.; NERY, T. B. R.; DRUZIAN, J. **Produção de polissacarídeo tipo goma xantana por xanthomonas em meio fermentativo com glicerol ou glicerina**. INPI, Patente: Privilégio de Inovação, PI0705950-7, 2009.

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.

BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. Plastics from bacteria and for bacteria: poly(3-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. **Biochemical Engineering and Biotechnology**, v. 41, p. 77-93, 1990.

BRAUNNEG, G. et al. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β – hydroxybutyric acid in microbial biomass. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 6, p. 29 – 37, 1978.

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates,

biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 65, p. 127-161, 1998.

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

CARASCHI, J. C.; RAMOS, U. M.; LEÃO, A. L. Compósitos biodegradáveis de polihidroxibutirato (PHB) reforçado com farinha de madeira: propriedades e degradação. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 6, p. 1609-1614, 2002.

CARDONA, C.; POSADA, J.; MONTOYA, M. Use of Glycerol from Biodiesel Production: Conversion to Added Value Products. In: **Proceedings of European Congress of Chemical Engineering**, v. 1, p. 16-20, 2007.

CAVALHEIRO, J. M. B. T.; ALMEIDA, M. C. M. D.; GRANDFELS, 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., RAPOSO, R. S., DE ALMEIDA, M. C., TERESA, C. M., SEVRIN, C., DA GRAND, FILS. C., FONSECA, M.M. 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.

ÇELİK, E.; OZBAY, N.; OKTAR, N.; ÇALIK, P. Use of biodiesel byproduct crude glycerol as the carbon source for fermentation processes by recombinant *Pichia pastoris*. [Industrial & Engineering Chemistry Research](#), v. 4, p. 2985-2990, 2008.

CELULOSE ONLINE. **Brasil é o 3º maior produtor de biodiesel do mundo**. Disponível em: www.celuloseonline.com.br/aulas. Acesso em: 22 de julho de 2013.

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS (CGEE). **Estudo sobre as**

possibilidades e impactos da produção de grandes quantidades de bioplásticos – Fase 2. Relatório Final. Brasília: CGEE, 2013.

CHAKRABORTY, P.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; GIBBONS, W. R. PHA Productivity and Yield of *Ralstonia eutropha* When Intermittently or Continuously Fed a Mixture of Short Chain Fatty Acids. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p.1-8, 2012.

CHEN, G. Q.; WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. **Biomaterials**, v.26, p.6565-6578, 2005.

CHEN, Y. et al. Bionanocomposite based on pea starch and cellulose nanowhiskers hydrolyzed from pea hull fibre: effect of hydrolysis time. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p.607-615, 2009.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. **Progress in Polymer Science**. v. 23. n. 7. p. 1273-1335, 1998.

CHOI, J.; LEE, S.Y. Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. **Bioprocess Engineering**. v. 17. p. 335-342, 1997.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology**. Madison, Science Tech, Inc., cap.5. 1984.

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

DALCANTON, F. **Produção, extração e caracterização de poli (3-hidroxi butirato) por *Ralstonia eutropha* em diferentes substratos**. 2006. 132 p. Tese (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Santa Catarina.

DALCANTON, F.; IENCZAK, J. L.; FIORESE, M. L.; ARAGÃO, G. M. F. Produção de poli (3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator* em meio hidrolisado de amido de arroz com suplementação de óleo de soja em diferentes temperaturas. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 552-556, 2010.

DELGADO, C. C. R. **Estudo da Biossíntese de Poli-3-hidroxibutirato (P3HB) a partir de Óleo de Soja**. 2006. 114 p. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo.

DOBROTH, Z. T.; HU, S.; COATS, E. R.; MCDONALD, A. G. Polyhydroxybutyrate synthesis on biodiesel wastewater using mixed microbial consortia. **Bioresource Technology**. v. 102. n. 3. p. 3352-3359. 2011.

DUARTE, M. A. T.; C. F. JÚLIO; E. S. MARTINS; S. H. PEZZIN. Estudo da Compactação a Frio de Poli (3-Hidroxibutirato)-Morfologia e Resistência à Compressão. **Revista Matéria**, v. 9, p. 386-391, 2004.

FACCIN, D. J. L. et al. Optimization of C :N ratio and minimal initial carbon source for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium* Journal of [Chemical Technology and Biotechnology](#), v. 84, p. 1756–1761, 2009.

FALCONE, D. M. B.; AGNELLI, J. A. M. Panorama setorial e perspectivas na área de polímeros biodegradáveis. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v. 17. n. 1. p. 5-9, 2007.

FARIAS, D. **Produção e caracterização de poli(3-hidroxibutirato-co-3hidroxivalerato) por *Cupriavidus necator* em melão cítrico**. 2009, 123 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Santa Catarina.

FARIA, A. U.; MARTINS-FRANCHETTI, S. M. Biodegradação de filmes de polipropileno (PP), poli(3-hidroxibutirato) (PHB) e blenda de PP/PHB por microrganismos das águas do rio Atibaia. **Revista Polímeros**. v. 20, n.2, p.141-147,

2010.

FIGLIANO, M. L. **Avaliação do crescimento de *Ralstonia eutropha* em resíduo da indústria de alimentos para a produção de poli-hidroxibutirato**. 2004. 107 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Santa Catarina.

FIGLIANO, M. L. **Estratégias de cultivo e recuperação e caracterização de poli (3-hidroxibutirato) produzido por *Ralstonia eutropha***. 2008. 180 p. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Santa Catarina.

FIGLIANO, M. C. et al. Biossíntese de polímero biodegradável: caracterização térmica e espectroscópica. **Anais do VII Congresso Brasileiro de Polímeros**. Belo Horizonte. 2003. Associação Brasileira de Polímeros.

FIGLIANO, S. M. M.; FIGLIANO, J. C. Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.

FIGLIANO, N., FIGLIANO, C., FIGLIANO, R., FIGLIANO, J., FIGLIANO, A., FIGLIANO, J.S. Characterization and application of poly(β -hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials. **Polymer Testing**, v. 19. p. 485-492 , 2000.

FIGLIANO, E.; FIGLIANO, G.; FIGLIANO, M. E. Preservation of *Xanthomonas campestris* on agar slopes: Effects on xanthan Production. **Applied. Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 634-637, 1994.

FIGLIANO, F. G.; FIGLIANO, J. L. F. da. Bioconversão de resíduos agroindustriais – uma revisão. **Série em Ciência e Tecnologia de Alimentos: Agroindústria, Energia e Meio Ambiente**. UTFPR, Campus Ponta Grossa, 2008.

FIGLIANO, M. C. F. **Desenvolvimento de um processo de extração de poli (3-**

hidroxibutirato) produzido por *Cupriavidus necator* e seu efeito sobre as características do polímero. 2006. 138 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Santa Catarina.

GARCÍA, I. L.; LÓPEZ, J. A.; DORADO, M. P.; KOPSAHELIS, N.; ALEXANDRI, M.; PAPANIKOLAOU, S.; VILLAR, M. A.; KOUTINAS, A. A. 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.

GOMES, J. G. C. **Produção por *Pseudomonas* SP de Polihidroxicanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos.** 2000. 155p. Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

GOMEZ, J. G. C.; FONTOLAN, V.; ALLI, R. C. P.; RODRIGUES, M. F. A.; BUENO NETTO, C. L.; SILVA, L. F.; SIMÕES, D. A. Production of P3HB-co-3HV by soil isolated bacteria able to use sucrose. **Revista de Microbiologia**, v. 28 (Suppl. 1), p. 43-48, 1997.

GÖZKE, G.; PRECHTL, C.; KIRSCHHÖFER, F.; MOTHES, G.; ONDRUSCHKA, J.; BRENNER-WEISS, G.; OBST, U.; POSTEN, C. Electrofiltration as a purification strategy for microbial poly-(3-hydroxybutyrate). **Bioresource Technology**. v. 123. p.272–278, 2012.

GRAGE, K.; JAHNS, A. C.; PARLANE, N.; PALANISAMY, R.; RASIAH, I. A.; ATWOOD, J. A.; REHM, B. H. Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. **Biomacromolecules**, v.10, p.660-669, 2009.

GROTHER, E.; MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y. Fermentation optimization for the production of poly(β -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 132-141, 1999.

HAAS R.; JIN B.; ZEPF F. T. Production of poly (3-hydroxybutyrate) from waste potato starch. **Bioscience, biotechnology and biochemistry**, v. 72, p.253-256, 2008.

HÄNGGI, U.J. Requirements on bacterial polyesters as future substitute for conventional plastics for consumer goods. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, p.213-220. 1995.

HANSEN, K.; ANGELIDAKI, I.; AHRING, B. K. Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia. **Water Research**. v. 32, p. 5-12. 1998.

HARDING, N. E.; CLEARY, J. M.; IELPI, L. Genetic and Biochemistry of Xanthan Gum Production by *Xanthomonas campestris*, L. In: HUI, Y. H., KHACHATOURIANS, G. G. **Food Biotechnology Microorganisms**. USA: VCH, p. 495-514, 1995.

HISS, H. Cinética de Processos Fermentativos. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotechnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**, v.2, São Paulo: Editora Edgard Blucher LTDA., 2001.

HOLMES, P. A.; LIM, G.B. Separation process. US **Patent** 4,910,14. 1990.

HONG, K.; SUN, S.; TIAN, W.; CHEN, G. Q.; HUANG W. A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.51, p.523-526, 1999.

HRABAK, O. Industrial production of poly- β -hydroxybutyrate. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 103, p. 251–255, 1992.

HUANG, S. J.; EDELMAN, P. G.; **Degradable Polymers: Principles and Applications**. Chapman & Hall. London. 1995.

IBRAHIM, M. H. A.; STEINBÜCHEL, A. Poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via high-cell-density fed-batch fermentation and simplified solvent extraction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 9, p. 6222-6231, 2009.

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

JAYASEELAN, C.; RAHUMAN, A. A.; RAJAKUMAR, G.; SANTHOSHKUMAR, T.; KIRTHI, A.V.; MARIMUTHU, S.; BAGAVAN, A.; KAMARAJ, C.; ZAHIR, A. A.; ELANGO, G.; VELAYUTHAM, K.; RAO, K. V.; KARTHIK, L.; RAVEENDRAN, S. Efficacy of plant-mediated synthesized silver nanoparticles against hematophagous parasites. **Parasitology Research**, v. 111, n. 2, p.921–933, 2012.

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. 338-348, 2007.

KAHAR, P.; TSUGE, T.; TAGUCHI, K.; DOI, Y. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. **Polymer Degradation and Stability**, v. 83, p. 79-86, 2004.

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

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Computer simulated fed-batch cultivation for

over production of PHB: a comparison of simultaneous and alternate feeding of carbon and nitrogen. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p.197-203, 2005.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Computer simulated fed-batch cultivation for over production of PHB: A comparison of simultaneous and alternate feeding of carbon and nitrogen. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, n. 3, p. 197-203, 2006.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K., Production of Poly (3-Hydroxybutyricco-3-Hydroxyvaleric Acid) Having a High Hydroxyvalerate Content with Valeric Acid Feeding, **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 34, n. 6, p. 457-461, 2007.

KHARDENAVIS, A.A.; KUMAR, M.S.; MUDLIAR, S.N.; CHAKRABARTI, T. Biotechnological conversion of agro-industrial wastewaters into biodegradable plastic, poly-₃-hydroxybutyrate, **Biosource Technology**, v. 98, p. 3579-3584, 2007.

KIM, B. S. Production of poly(3-hiroxybutyrate) from inexpensive substrates. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 27, p. 774-777. 2000.

KIM, Y. B.; LENZ, R. W. Polyesters from microorganisms. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, v.71, p.51-79, 2001.

KOLLER, M.; HESSE, P.; BONA, R.; KUTSCHERA, C.; ATLIĆ, A.; BRAUNEGG, G. Biosynthesis of high quality polyhydroxyalkanoate co- and terpolyesters for potential medical application by the archaeon *Haloferax mediterranei*. **Macromolecular Symposia**, v. 253, n. 1, p. 33-39, 2007.

KOLLER, M. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biosynthesis from Whey Lactose. **Macromol. Symp.** n. 272, p. 87–92, 2008.

KULPREECHA, S.; BOONRUANGTHAVORN, A.; MEKSIRIPORN, B.; THONGCHUL, N. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate)

production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n.3, p. 240-245. 2009.

LAMAISON, F. C. **Aplicação da água residuária do processamento da mandioca como substrato para a produção de hidrogênio por processo fermentativo**. 2009. 83 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Santa Catarina.

LAUFENBERG, G. Transformation of vegetable waste into added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, p.167-198, 2003.

LAW, K.H.; CHENG, Y.C.; LEUNG, Y.C.; LO, W.H.; CHUA, H.; YU, H.F. Construction of recombinant *Bacillus subtilis* strains for polyhydroxyalkanoates synthesis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 203-208, 2003.

LE DUY, A.; ZAJIC, J. E. A geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point: applied to growth and product formation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 15, n. 4, p. 805-810, 1973.

LEE, S. Y.; KIM, M. K.; CHANG, H. N.; PARK, Y. H. Regulation of poly-beta-hydroxybutyrate biosynthesis by nicotinamide nucleotide in *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 131, p. 35-39, 1995.

LEE, S. Y. Plastic bacteria: Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Tibtech**, v. 14, p. 431-438. 1996.

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.1-3, p. 387-393, 1997.

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, p.387-393, 1998.

LEE, S. Y.; WONG, H. H.; CHOI, J.; LEE, L. H.; LEE, S. C.; HAN, C. S. Production of mediumchain-length polyhydroxyalkanoates by high-cell-density cultivation of *Pseudomonas putrida* under phosphorus limitation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, n.4, 2000.

LEE, S. Y.; PARK, S. H.; HONG, S. H.; LEE, Y.; LEE, S. H. **Fermentative production of building blocks for chemical synthesis of polyesters**. In: STEINBÜCHEL, A; DOI, Y. Biopolymers. v.3. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.

LUENGO, J.; SANDOVAL, A.; NAHARRO, G; OLIVEIRA, E. Bioplastics from microorganisms. **Current Opinion in Microbiology**, v.6, p.251-260, 2003.

MADDEN, L.A.; ANDERSON, A.J.; SHAH, D.T.; ASRAR, J. Chain termination in polyhydroxyalkanoate synthesis: involvement of exogeneous hydroxyl-compounds as chain transfer agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 43-53, 1999.

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.

MAIORELLA, B.L.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. Alcohol production and recovery. In: flechter, A. **Advances in biochemical engineering**. v. 20, p. 41-73, 1981.

MARANGONI, C. **Estudo de estratégias de produção de Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por *Ralstonia eutropha* utilizando substratos de baixo custo e ácido propiônico**. 2000. 191 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Santa Catarina

MARANGONI, C.; FURIGO, Jr, A.; ARAGÃO, G. M. F. Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 137-141. 2002.

MARSUDI, S.; UNNO, H.; HORI, K. Palm oil utilization for the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology Biotechnology**, n. 78, p. 955–961, 2008.

MELERO, J.A.; VICENTE, G.; PANIAGUA, M.; MORALES, G.; MUNOZ. P. Etherification of biodiesel derived glycerol with ethanol for fuel formulation over sulfonic modified catalysts. **Bioresource Technology**, v. 103, n.1, p.142–51, 2012.

MIRALLES, J. **Ecologia Para Organizações Juvenis**. Lisboa: APCC, 1999.

MIZUNO, K.; OHTA, A.; HYAKUTAKE, M.; ICHINOMIYA, Y.; TSUGE, T. Isolation of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria from a polluted soil and characterization of the isolated strain *Bacillus cereus* YB-4. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n.8, p. 1335-1339, 2010.

MORALEJO-GÁRATE, H.; MAR'ATUSALIHAT, E.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Microbial community engineering for biopolymer production from glycerol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 3, p. 631 – 639, 2011.

MORALEJO-GA'RATE, H.; KLEEREBEZEM, R.; MOSQUERA-CORRAL, B. M.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Impact of oxygen limitation on glycerol-based biopolymer production by bacterial enrichments. **Water research**, v. 47, p. 1209 – 1217, 2013.

MOTHES, G.; SCHNORPFEIL, C.; ACKERMANN, J.U. Production of PHB from crude glycerol. **Engineering in Life Sciences**, v. 7, n.5, p. 475-479, 2007.

MYERS, R.H.; MONTGOMERY, D.C. **Response Surface Methodology, Process and Product Optimization Using Designed Experiments**, 2nd ed., John Wiley and Sons Inc., 2002.

NASCIMENTO, J.F. **Estudo da processabilidade e da caracterização do poli(ácido 3-hidroxibutírico) – PHB obtido a partir de cana-de-açúcar**. 2001, 74p. Dissertação (Mestrado). Pós-Graduação em Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

NATH, A.; DIXIT, M.; BANDIYA, A.; CHAVDA, S.; DESAI, A. J. Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. **Bioresources Technology**, v.99, p.5749-5755, 2008.

NIKEL, P. I.; ALMEIDA, A.; MELILLO, E. C.; GALVAGNO, M. A.; PETTINARI, M. J. New recombinant *Escherichia coli* strain tailored for the production of poly(3-hydroxybutyrate) from agroindustrial by-products. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.3949-3954, 2006.

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

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

OLIVEIRA, M. E.; NOGUEIRA, M. H. **Biogás: Uma energia de alternativa**. Lisboa: Laboratório Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial. Departamento de energias renováveis. 1984.

OTAKE, Y.; KOBAYASHI, T.; ASBE, H.; MURAKAMI, N.; ONO, K. Biodegradation

of low-density polyethylene, polystyrene, polyvinyl chloride and urea formaldehyde resin buried under soil for over 32 years. **Journal Applied Polymer Science**, n 56, 1995.

PAGE, W.J.; SHERBURNE, R.; D'ELIA, L.; GRAHAM, L. L. Poly(-hydroxybutyrate) extrusion from pleomorphic cells of *Azotobacter vinelandii* UWD. **Canadian Journal Microbiology**, v. 41, p. 22–31, 1995.

PAGE, R. D. M. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Bioscience**, v. 12, p. 357-358, 1996.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHEL, D. New developments in solid state fermentation: I – bioprocess and products. **Journal Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PANDEY, A. **Concise encyclopedia of bioresource technology**. Food Products Press, New York, 2004.

PANDIAN, S. R. Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3. **Bioresource Technology**, n. 101, p. 705–711, 2010.

PANTAZAKI, A. A.; IOANNOU, A. K.; KYRIAKIDIS, D. A. A thermostable beta-ketothiolase of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in *Thermus thermophilus*: purification and biochemical properties. **Molecular Cell Biochemistry**, v. 269, p. 27–36, 2005.

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; MARC, I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. **Journal Applied Microbiology**, v. 92, p.737–44, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Biotechnological

valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 60-71, 2008.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. de O. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal Technology Manag. Innov.** v. 2, p. 118-127, 2007.

PIEMOLINI, L. T. **Modelagem estrutural da PHA sintase de *Chromobacterium violaceum* para estudos de mutação sítio-dirigida.** 2003. 90p. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Santa Catarina.

POSADA, J. A.; NARANJO, J. M.; LÓPEZ, J. A.; HIGUITA, J. C.; CARDONA, C. A. Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 310–317, 2011.

PRADELLA, J. G. C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos.** Relatório técnico n. 84396-205. Centro de Tecnologia de Processos e Produtos. Laboratório de Biotecnologia Industrial –LBI/CTPP. São Paulo. 2006.

QUINES, L. K. M. **Extração de poli (3-hidroxi-butirato) produzido por *Cupriavidus necator* dsm 545 com 1,2-carbonato de propileno.** 2010. 99 p. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Santa Catarina.

RAGHAVAN, D. Characterization of biodegradable plastics. **Polymer Plastics Technology and Engineering**, v. 34, n.1, p.41-63, 1995.

RAMADAS, N. V.; SINGH, S. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Polyhydroxybutyrate production using agro-industrial residue as substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 1, p. 17-23. 2009.

RAMSAY, B. A.; RAMSAY, J. A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; BATAILLE, P. Production of poly-(β -hydroxybutyric-*co*- β -hydroxyvaleric) acid copolymers. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2093-2098, 1990.

RAMSAY, B.A. Physiological factor affecting PHA production. Physiology, kinetics, production and use of biopolymers. **Proceedings**, p. 9-7, 1994.

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

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. v.3. Pelotas: Gráfica Universitária, 218 p, 2000.

REHM, B. H. A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. **Biochemistry Journal**, v. 376, p. 15 – 33. 2003.

REIS, E. C.; ALMEIDA, M.; CARDOSO, J. C.; PEREIRA, M. A.; OLIVEIRA, C. B. Z.; VENCESLAU, E. M.; DRUZIAN, J. I.; MARIANO, R.; PADILHA, F. F. Biopolymer Synthesized by Strains of *Xanthomonas* Sp Isolate from Brazil Using Biodiesel-Waste. **Macromolecular Symposia**, v. 296, p. 347–353, 2010.

REPASKE, R.; REPASKE, A. C. Quantitative requirements for exponential growth of *Alcaligenes eutrophus*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 32, n.4, p. 585-591, 1976.

RETO, M. A. S. **Plástico Biodegradável**. *Revista Plástico Moderno*, n. 432, out 2010. Disponível em <<http://www.plastico.com.br/reportagem.php?rrid=53>>. Acesso em: 04 mai. 2013.

RODRIGUES, A. D. **Estudo da produção de poli-hidroxibutirato por *Cupriavidus necator* em fermentação no estado sólido**. 2005a. 87 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Engenharia Química da COPPE, Rio de Janeiro.

RODRIGUES, R. C. **Condições de cultura para a produção de poli (3-hidroxi-butarato) por *Ralstonia eutropha* a partir de resíduos de indústrias de alimentos**. 2005b. 90 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Santa Catarina..

RODRIGUES, M. F. A. **Plásticos Biodegradáveis**. IPT. São Paulo, 2002. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/noticentro/2007/08/maria_filomena.pdf>. Acesso em: 08 ago. 2013.

ROSA, D. S.; CHUL, Q. S. H.; FILHO, R. P.; AGNELLI, J. A. M. Avaliação da biodegradação de poli-beta-(hidroxibutarato), poli-beta-(hidroxibutarato-co-valerato) e poli-(-coprolactona) em solo compostado. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 12, p. 311-317, 2002.

ROSA, D. S.; LOTTO, N. T.; GUEDES, C. G. F. The use of roughness for evaluating the biodegradation of poly-b-(hydroxybutyrate) and poly-b-(hydroxybutyrate-co-b-valerate). **Polymer Testing**, v. 23, n. 3. P. 447-452, 2004.

ROHINI, D.; PHADNIS, S.; RAWAL, S.K. Synthesis and characterization of poly- -hydroxybutyrate from *Bacillus thuringiensis* R1. **Indian Journal Biotechnology**, v. 5. p. 276–283, 2006.

RYWIŃSKA, A.; RYMOWICZ, W. Continuous production of citric acid from raw glycerol by *Yarrowia lipolytica* in cell recycle cultivation. **Chemical Papers**, v. 65, n.2, p. 119-123, 2011.

SALAMATINIA, B.; MOOTABADI, H.; BHATIA, S.; ABDULLAH, A. Z. Optimization of ultrasonicassisted heterogeneous biodiesel production from palm oil: a response surface methodology approach. **Fuel Process Technol**, v.91, n. 5, p.441–448, 2010.

SÁNCHEZ, R. J.; SCHRIPSEMA, J.; DA SILVA, L. F., et al. Medium-chain-length polyhydroxyalkanoic acids (PHAmcl) produced by *Pseudomonas putida* IPT 046 from renewable sources. **European Polymer Journal**, v. 39, n.7, p. 1385-1394, 2003.

SANGKHARAK, K.; PRASERTSAN, P. Optimization of polyhydroxybutyrate production from wild type and two mutant strains of *Rhodobacter sphaeroides* using statistical method. **Journal Biotechnology**, v. 132, p. 331-340, 2007.

SANTOS, C. E. O.; RODRIGUES, T. C.; ROSA, D. S.; CALIL, M. R. O efeito da irradiação UV – B na biodegradação dos polímeros PCL e PHB. In: 6º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2001, Belo Horizonte. **Anais do 6º Congresso Brasileiro de Polímeros**.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; REGO, R. A. **Brasil pack trends 2020**. Campinas: ITAL, 1. ed. 227 p. 2012.

SCHMIDELL, W. Agitação e aeração em biorreatores. In: **Biotecnologia Industrial Vol II: Engenharia Bioquímica**. (Schmidell W., Lima U.A., Aquarone E., Borzani W., eds.), São Paulo, Ed. Edgard Blücher LTDA., p. 277-331, 2001.

SENIOR, P. J; DAWES, E. A. Poly- γ -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. **Biochemical Journal**, v. 125, p. 55-66. 1971.

SERAFIM, L. S.; LEMOS, P. C.; ALBUQUERQUE, M. G.; REIS, M. A. Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. **Applied and Environmental Microbiology**, v.81, p.615-628, 2008.

SHEU, D. S.; LAI, Y. W.; CHANG, R. C.; CHEN, W. M. Detection of polyhydroxyalkanoate synthase activity on a polyacrylamide gel. **Analytical Biochemistry**, v. 393, p.62–66, 2009.

SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; ROCHA, R. C. S.; TACIRO, M. K.; PRADELLA, G. da C. Produção biotecnológica de poli-hidroxicanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, v. 30, n. 7. 2007.

SILVA, A. N.; Garcia-Cruz, C. H. A metodologia de superfície de resposta como ferramenta para a avaliação da produção de alginato e poli-hidroxibutirato pela *Azotobacter vinelandii*. **Acta Scientiarum. Technology (Online)**, v. 32, p. 105-112, 2010.

SILVA, R. G. **Técnicas de Inferência de Estado Aplicadas ao Processo de Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945**. 2003. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

SIM, S. J., SNELL, K.D., HOGAN, S.A., et al. PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 63-67, 1997.

SQUIO, C. R. **Estratégias de Alimentação e Utilização de Suplementos Nutricionais na Produção de Poli (3-Hidroxibutirato-co-3-Hidroxivalerato) por *Ralstonia eutropha***. 2003. 161 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Santa Catarina.

SQUIO, C. R.; ARAGÃO, G. M. F. Estratégias de cultivo para a produção dos plásticos biodegradáveis poli (3-Hidroxibutirato) e poli (3-hidroxibutirato-co-3- hidroxivalerato) por bactérias. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 615-622. 2004.

STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H.E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiol. Letter**, v. 128, p. 219-228, 1995.

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

STREDANSKI, M.; CONTI, E.; NAVARINI, L.; BERTOCCHI, C. Production of bacterial exopolysaccharide by solid substrate fermentation. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 11-16, 1999.

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

SUTHERLAND, I. A sticky business: microbial polysaccharides: current products and future trends. **Microbiology Today**, v. 29, p. 70-71, 2002.

TAIDI, B.; MANSFIELD, D. A.; ANDERSON, A. J. Turnover of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and its influence on the molecular mass of the polymer accumulated by *Alcaligenes eutrophus* during batch culture. **FEMS Microbiology Letters**, v. 129, p. 201 – 205, 1995.

TANAKA, K. et al. Production of poly-(D-3- hydroxybutyrate) from CO₂, H₂ and O₂ by high cell density autotrophic cultivation of *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology Bioengineering**, v. 45, p. 268 – 275, 1994.

TAVARES, L. Z.; SILVA, E. S.; PRADELLA, J. G. C. Production of poly(3-hydroxybutyrate) in an airlift bioreactor by *Ralstonia eutropha*. **Bioscience Engineering Journal**, p.18-21, 2004.

TAY, B.Y.; LOKESH, B.E.; LEE, C.Y.; SUDESH, K. Polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulating bacteria from the gut of higher termite *Macrotermes carbonarius* (Blattodea: Termitidae). **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 26, p. 1015 – 1024, 2010.

TEODORO, J. C.; BAPTISTA-NETO, A.; ARAUJO, M. L. G. C.; HOKKA, C. O.; BADINO, A. C. Influence of glycerol and ornithine feeding on clavuronic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Brazil Journal of Chemical Engineering**,

27, n. 4, p. 499-506, 2010.

THOMPSON, J. C.; HE, B. B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feed stocks. **Applied Engineering Agricultural**, v. 22, n. 2, p. 261–5, 2006.

TIAN, J.; SINSKEY, A. J.; STUBBE, J. Kinetic Studies of Polyhydroxybutyrate Granule Formation in *Wautersia eutropha* H16 by Transmission Electron Microscopy. **Journal of Bacteriology**, p. 3814-3824, 2005.

TIM, A.; STEINBUCHER, A. Formation of polyester consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent *Pseudomonas*. **Applied and Environ. Microbiology**, v. 56, p. 3360 - 3367. 1990.

TRIPATHI A. D., YADAV A., JHA A., SRIVASTAVA S. Utilizing of Sugar Refinery Waste for Production of Bio-Plastic Under Submerged Fermentation Process. **Journal of Polymers and the Environment**, p. 1-8, 2012.

TRIPATHI, A. D.; SRIVASTAVA, B. S. K.; SINGH, C. R. P. Statistical optimization of physical process variables for bio-plastic (PHB) production by *Alcaligenes* sp. **Biomass and bioenergy**. v. 55. n. 24. p. 3-25, 2013.

TROEGER, C. N.; HARVEY, A. P. The Production of Polyhydroxyalkanoates Using an Oscillatory Baffled Bioreactor. **Chemical Product and Process Modeling**, v. 4, n. 5, p. 456 – 461, 2009.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). **EPA finalizes regulations for a renewable fuel standard (RFS) program for 2007 and beyond**, EPA420-F-07-019. Ann Arbor, MI: Office of Transportation and Air Quality; 2007.

USP – Instituto de Ciências Biomédicas. **Crescimento bacteriano**. São Paulo, 2009.

Disponível em: <http://www.icb.usp.br/bmm/grad/arquivos/BMM_0122_2009/aula_T8/crescimento%20e%20controle%201.pdf>. Acesso em: 08 ago. 2013.

VALENTIN, H. E.; MITSKY, T. A.; MAHADEO, D. A.; TRAN, M.; GRUYS, K. J. Application of a propionyl coenzyme A synthetase for poly(3-hydroxypropionate-co-3-hydroxybutyrate) accumulation in recombinant *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p.5253-5258, 2000.

VAN WEGEN, R. J.; LING, Y.; MIDDELBERG, A. P. J. Industrial production of polyhydroxyalkanoates using escherichia coli: An economic analysis. **Chemical Engineering Research and Design**, v.76, p.417 – 426, 1998.

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

VERHOOGT, H.; RAMSAY, B. A.; FAVIS, B. D. Polymer Blends containing poly (3-hydroxybutyrate). **Polymer**, v.35, n. 24, p. 5155-5169. 1994.

VOLOVA, T. G. Polyhydroxyalkanoates – Plastic Material of the 21st Century: Production, Properties and Application. **Nova Publishers**, New York, 1 ed. 282 p. 2004.

WANG, D. I. C.; COONEY, C. L.; DEMAIN, A. L.; DUNNIL, P.; HUPHREY, A.E.; LILLY, M. D. **Fermentation and Enzyme Technology**. Nova York, John Wiley and Sons, p. 93-97. 1979.

WANG, Y. J.; HUA, F. L.; TSANG, Y. F.; CHAN, S. Y.; SIN, S. N.; CHUA, H.; YU, P. H. F.; REN, N. Q. Synthesis of PHAs from waster under various C:N ratios. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 1690–1693, 2007

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.

WOICIECHOWSKI, A. L. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de xantana a partir de resíduos agroindustriais de café e de mandioca**. 2001. 100 p. Tese (Doutorado). Processos Biotecnológicos, Paraná.

YAMANE, T. Cultivation engineering of microbial bioplastics production. **Fems Microbiol. Reviews** , v. 103, p. 257-264, 1992.

YAMANE, T. Yield of poly-D(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: A theoretical study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, p. 165-170, 1993.

YU J, STAHL H. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8042-8048, 2008.

ZENI, G.; PENDRAK, I.P. **Bionconversão de celulose em proteína utilizando a levedura *Cândida utilis* e o fungo *Pleurotus ostreatus***. Ponta Grossa: Trabalho de conclusao de curso apresentado a Universidade Federal Tecnológica do Parana, 2006.

ZHU, C.; NOMURA, C. T.; PERROTTA, J. A.; STIPANOVIC, A. J.; NAKAS, J. P. Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from biodiesel-glycerol by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759. **Biotechnology Progress**, v. 26, p. 424-430, 2010.

ZHU, Y.; LI, J.; TAN, M.; LIU, L.; JIANG, L.; SUN, J.; LEE, P.; DU, G. ; CHEN. J. Optimization and scale up of propionic acid production by propionic acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source. **Bioresource Technology**, v.101, n.22, p. 8902-8906, 2009.