

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE - UNIVILLE
MESTRADO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS

**PRODUÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) POR *Cupriavidus necator* EM
PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO COM PULSO DE GLICEROL**

BRUNA REGINA SOMBRIO

JOINVILLE
2015

BRUNA REGINA SOMBRIO

PRODUÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) POR *Cupriavidus necator* EM
PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO COM PULSO DE GLICEROL

Trabalho apresentado como requisito
para obtenção do título de Mestre em
Engenharia de Processos na
Universidade da Região de Joinville -
UNIVILLE.

Professora Orientadora: Andréa Lima
dos Santos Schneider

Professora co-Orientadora: Ana Paula
Testa Pezzin

JOINVILLE

2015

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

S693p	<p>Sombrio, Bruna Regina Produção de poli(3-hidroxitirato) por <i>Cupriavidus necator</i> em processo descontinuo alimentado com pulso de glicerol / Bruna Regina Sombrio; orientadora Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider, Co-orientadora Dra. Ana Paula Testa Pezzin – Joinville: UNIVILLE, 2015.</p> <p>94 f. : il. ; 30 cm</p> <p>Dissertação (Mestrado em Engenharia dos Processos – Universidade da Região de Joinville)</p> <p>1. Poliésteres. 2. Polímeros biodegradáveis. 3. Glicerol. I. Schneider, Andréa Lima dos Santos II. Pezzin, Ana Paula Testa (co-orient.). III. Título.</p> <p>CDD 632.951</p>
-------	--

Termo de Aprovação

“Produção de poli(3-hidroxiбутирато) por *Cupriavidus necator* em processo descontínuo alimentado com pulso de glicerol”

por

Bruna Regina Sombrio

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos, área de concentração Engenharia de Processos e Tecnologias Limpas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Engenharia de Processos.


Prof. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
Orientadora (UNIVILLE)

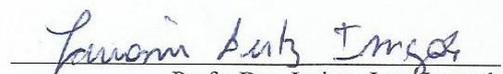

Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Coorientadora (UNIVILLE)

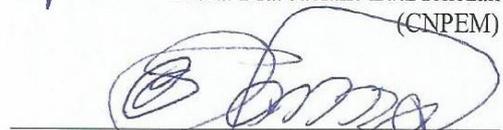

Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Coordenadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Processos (UNIVILLE)

Banca Examinadora:


Prof. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider
Orientadora (UNIVILLE)


Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Coorientadora (UNIVILLE)


Prof. Dra. Jaciane Lutz Ienczak
(CNPEN)


Prof. Dr. Ozair Souza
(UNIVILLE)

Joinville, 30 de março de 2015.

MENSAGEM

“Se eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos.

A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo afora...

Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem.

A capacidade de escolher novos rumos.

Deixaria para você, se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável:

Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação.

E, quando tudo mais faltasse, um segredo:

O de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída.”

(Mahatma Gandhi)

AGRADECIMENTOS

“A gratidão é uma forma singular de reconhecimento, e o reconhecimento é uma forma sincera de gratidão.”

(Alan Vaszatte)

Dedico esse trabalho aos meus pais, Noemi e Celino, por me terem dado educação, valores e, acima de tudo, amor incondicional. Dedico também a minha irmã Lidiane, que sempre esteve ao meu lado. Agradeço pelo incentivo, carinho e compreensão em todos os momentos, por me ajudarem e protegerem, e principalmente por acolherem minhas decisões, dando-me sempre a liberdade necessária para aprender. Partilho a alegria deste momento com vocês que muitas vezes renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu.

Agradeço também a todos os meus familiares, avós, primos e tios, pelo convívio, pela amizade, pelos momentos de descontração, de incentivo e de alegrias.

À professora Doutora Andréa Lima dos Santos Schneider, minha orientadora desde os tempos de Iniciação Científica. Obrigada pelos seus intermináveis ensinamentos, pelos seus preciosos e importantes conselhos e também pela sua inestimável confiança.

Agradeço também as professoras Ana Paula Testa Pezzin e Giannini Pasiznick Apati que me ajudaram com alguns de seus conhecimentos para o enriquecimento desse trabalho. Manifesto meu agradecimento também a Cláudia Hack Gumz Correia pelas análises realizadas durante esse tempo de pesquisa e a todos os professores do programa de Mestrado em Engenharia de Processos, pelos conhecimentos a mim transmitidos.

A todos os meus amigos, de laboratório e sala de aula, pela amizade e companheirismo do dia-a-dia, e também pela ajuda e dedicação em algumas das etapas deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos aos professores que aceitaram participar da banca examinadora da defesa, enriquecendo este trabalho com suas avaliações e contribuições.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro a esta pesquisa e a UNIVILLE pela oportunidade de desenvolvimento da mesma.

Por fim, agradeço a Deus por permitir que tudo isso acontecesse ao longo de minha vida, pela força e discernimento nos momentos mais difíceis e por colocar todas essas pessoas maravilhosas no meu caminho.

RESUMO

O poli(3-hidroxi-butirato), P(3HB), é um poliéster natural e biodegradável, produzido e acumulado como reserva energética por diversos micro-organismos. É considerado um atrativo substituto para os polímeros petroquímicos, pois tem a vantagem de ser degradado no solo em poucos meses pela ação de micro-organismos. Em decorrência da política nacional de adição de biodiesel nos combustíveis fósseis o glicerol, principal subproduto do biodiesel, está sendo produzido em larga escala devido à ascensão do uso de biocombustíveis, portanto é necessário encontrar utilizações comerciais para os excedentes dessa produção. O glicerol pode ser utilizado para diversas finalidades, dentre elas, como fonte de carbono no cultivo de micro-organismos. Diante da disponibilidade de glicerol, a proposta deste trabalho foi sintetizar P(3HB) a partir do cultivo da bactéria *Cupriavidus necator* tendo glicerol como fonte de carbono adicional em diferentes condições realizadas em duplicata: sem adição de glicerol (SG), com adição de 20 g L⁻¹ de glicerol na fase de produção celular (AG-FP) e adição de 20 g L⁻¹ de glicerol no início do cultivo (AG-IC), a fim de avaliar seu efeito sobre o crescimento celular e a síntese do polímero. Os resultados demonstraram que a adição de glicerol no início do cultivo levou a maiores valores de percentual de acúmulo de P(3HB) (64,12 %) e de produtividade em P(3HB) na fase de produção (0,32 g L⁻¹ h⁻¹), quando comparados aos ensaios em que a adição de glicerol foi apenas na fase de produção (AG-FP) ou quando não houve adição de glicerol (SG). Por outro lado, nos ensaios sem adição de glicerol foi possível observar os maiores valores de fator de conversão de substrato em biomassa (0,17 g g⁻¹) em relação aos ensaios com adição de glicerol. Os parâmetros de acúmulo de P(3HB) (%), fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{Xr/S}$) e produtividade em polímero na fase de produção ($P_{P(3HB)prod}$) apresentaram diferença estatística significativa em função da estratégia de cultivo utilizada. A caracterização dos polímeros sintetizados em biorreator evidenciou a formação de P(3HB) e verificou-se que a utilização de glicerol não modificou as propriedades do filme.

ABSTRACT

Poly(3-hydroxybutyrate), P(3HB), is a natural and biodegradable polyester, produced and accumulated as an energy reserve for various microorganisms. It is considered an attractive substitute for the petrochemical polymers, it has the advantage of being degraded in the soil within a few months by the action of microorganisms. As a result of the national policy of adding biodiesel in fossil fuels, glycerol, the main by-product of biodiesel is being produced on a large scale due to the rise of the use of biofuels, so it is need to find commercial uses for this surplus production. The glycerol may be used for several purposes, among them, as a carbon source for the cultivation of microorganisms. Given the availability of glycerol, the purpose of this study was to synthesize P(3HB) from the cultivation of the bacterium *Cupriavidus necator* with glycerol as a source of additional carbon in different conditions performed in duplicate: without glycerol (SG), with addition of 20 g L⁻¹ glycerol in the polymer produced (AG-FP) and addition of 20 g L⁻¹ of glycerol at the start of cultivation (AG-IC), in order to evaluate its effect on cell growth and the synthesis of the polymer. The results showed that the addition of glycerol at the start of culture led to highest values of accumulation percentage the P(3HB) (64.12%) and productivity in P(3HB) in the production phase (0.32 g L⁻¹ h⁻¹), when compared to the tests where the addition of glycerol was only in the production phase (AG-FP) or when there was no addition of glycerol (SG). On the other hand, in the experiments without glycerol, can be observed higher values of the biomass to substrate yield (0.17 g g⁻¹) when compared with tests in which there was no addition of glycerol. The parameters of accumulation of P(3HB) (%), of the biomass to substrate yield and polymer productivity in the production phase ($P_{P(3HB)prod}$) presented statistically significant differences in function of the cultivation strategy used. The characterization of the polymers synthesized in bioreactor showed the formation of P(3HB), and it was found that the use of glycerol did not modify the film properties.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural dos polihidroxialcanoatos (PHAs).....	22
Figura 2. <i>Cupriavidus necator</i> : (a) na fase de crescimento e (b) fase de acúmulo do polímero	25
Figura 3. Rota metabólica da síntese e degradação de poli(3-hidroxi-butirato) em <i>C. necator</i> (Lee, 1996b).	27
Figura 4. Estrutura do glicerol	28
Figura 5. Tendência dos principais mercados consumidores de glicerol e seus derivados.....	31
Figura 6. Exemplo de curvas termogravimétricas.	35
Figura 7. Apresentação de uma curva típica de DSC.	36
Figura 8. Equipamentos para cultivo em biorreator: a) vaso de cultivo de 2 L; b) motor de agitação; c) chicana e d) turbinas de Rushton.	47
Figura 9. Cinética de crescimento de <i>Cupriavidus necator</i> e produção de P(3HB) em cultivo realizado sem adição de glicerol.	59
Figura 10. Cinética de crescimento de <i>Cupriavidus necator</i> e produção de P(3HB) em cultivo realizado com adição de 20 g L ⁻¹ de glicerol na fase de produção do polímero.	60
Figura 11. Cinética de crescimento de <i>Cupriavidus necator</i> e produção de P(3HB) em cultivo realizado com adição de 20 g L ⁻¹ de glicerol no início do cultivo.	61
Figura 12. Gráfico de colunas com valores de produtividade na fase de produção do polímero (P _{P(3HB)prod}).	63
Figura 13. Produtividade em P(3HB) em função do tempo de cultivo: a) cultivo SG, b) cultivo AG-FP e c) AG-IC.	64
Figura 14. Gráfico de colunas com valores de fator de conversão global de substrato em biomassa residual.....	66
Figura 15. Espectrogramas de FTIR para os filmes de P(3HB).	68
Figura 16. Espectro de RMN ¹ H obtido para a amostra SG de P(3HB) em CDCl ₃	70
Figura 17. Espectro de RMN ¹ H obtido para a amostra AG-FP de P(3HB) em CDCl ₃	71
Figura 18. Espectro de RMN ¹ H obtido para a amostra AG-IC de P(3HB) em CDCl ₃	71

Figura 19. Curvas de TGA para os filmes de P(3HB) sintetizados sem glicerol (SG), com adição de glicerol na fase de produção (AG-FP) e com adição de glicerol no início do cultivo (AG-IC): a) termogravimetria (TG); b) termogravimetria derivada (DTG).	73
Figura 20. Curvas de DSC para os filmes de P(3HB) sintetizados sem glicerol (SG), com adição de glicerol na fase de produção (AG-FP) e com adição de glicerol no início do cultivo (AG-IC): a) primeiro aquecimento; b) segundo aquecimento.	75
Figura 21. Curva padrão de glicose para determinação da concentração de açúcar invertido.	90
Figura 22. Gráfico da concentração de nitrogênio dos ensaios realizados sem adição de glicerol.	91
Figura 23. Gráfico da concentração de nitrogênio dos ensaios realizados com adição de 20 g L ⁻¹ de glicerol na fase de produção do polímero.	91
Figura 24. Gráfico da concentração de nitrogênio dos ensaios realizados com adição de 20 g L ⁻¹ de glicerol no início do cultivo.	91
Figura 25. Gráfico de consumo de açúcar invertido dos ensaios realizados sem adição de glicerol.	92
Figura 26. Gráficos de consumo de substrato dos ensaios realizados com adição de 20 g L ⁻¹ de glicerol na fase de produção do polímero. (a) consumo de açúcar invertido e (b) consumo de glicerol.	92
Figura 27. Gráficos de consumo de substrato dos ensaios realizados com adição de 20 g L ⁻¹ de glicerol na fase de crescimento celular. (a) consumo de açúcar invertido e (b) consumo de glicerol.	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alguns representantes das famílias dos PHAs.....	22
Tabela 2. Resultados obtidos por alguns autores utilizando glicerol como fonte de carbono para a produção de PHA.	37
Tabela 3. Composição do meio mineral (MM).....	45
Tabela 4. Composição da solução de oligoelementos.	45
Tabela 5. Volumes de água, amostra e reagentes a serem utilizados na dosagem de nitrogênio.....	51
Tabela 6. Parâmetros cinéticos dos cultivos realizados sem adição de glicerol, com adição de 20 g L ⁻¹ de glicerol puro na fase de produção do polímero (AG-FP) e com adição de 20 g L ⁻¹ de glicerol puro no início do cultivo (AG-IC).....	57
Tabela 7. Teste t de Student para fator de conversão de substrato em biomassa residual (Y _{Xr/S}).	66
Tabela 8. Teste t de Student para acúmulo de P(3HB) (%).	67
Tabela 9. Teste t de Student para produtividade em polímero na fase de produção (P _{P(3HB)prod}).	67
Tabela 10. Relação de picos características no espectro de Infravermelho para os polímeros obtidos sem glicerol (SG), com adição de glicerol na fase de produção (AG-FP) e com adição de glicerol no início do cultivo (AG-IC) comparados com a literatura.	69
Tabela 11. Deslocamentos químicos característicos do P(3HB).....	72
Tabela 12. Dados de perda de massa, T _{onset} e T _{máx} obtidos das curvas de TG e DTG para as amostras SG, AG-FP e AG-IC.....	73
Tabela 13. Dados de temperatura de transição vítrea (T _g), temperatura de fusão cristalina (T _m), entalpia de fusão (ΔH _m) e grau de cristalinidade (α _c) para os polímeros sintetizados sem glicerol (SG) e com adição de glicerol puro na fase de produção (AG-FP) e no início do cultivo celular (AG-IC).....	76
Tabela 14. Teste t de Student para biomassa residual (X _r).	93
Tabela 15. Teste t de Student para concentração total de P(3HB).	93
Tabela 16. Teste t de Student para produtividade em célula (P _{Xr}).	93
Tabela 17. Teste t de Student para produtividade global em polímero (P _{gP(3HB)}).	93

Tabela 18. Teste t de Student para fator de conversão de substrato em polímero ($Y_{P(3HB)/S}$).....	94
Tabela 19. Teste t de Student para fator de conversão de substrato em células na fase de crescimento ($Y_{Xr/S \text{ cresc}}$).....	94
Tabela 20. Teste t de Student para fator de conversão de substrato em produto na fase de produção ($Y_{P(3HB)/S \text{ prod}}$).....	94
Tabela 21. Teste t de Student para velocidade máxima de crescimento celular (μ_{\max}).....	94

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

3HB – 3-hidroxi-butirato

3HV – 3-hidroxi-valerato

4HB – 4-hidroxi-butirato

5HB – 5-hidroxi-butirato

AG-IC – experimento realizado com adição de glicerol no início do cultivo

AG-FP – experimento realizado com adição de glicerol na fase de produção do polímero

CDCl₃ – clorofórmio deuterado

CG – cromatografia gasosa

DNS – ácido 3-5 dinitrosalicílico

DSC – calorimetria diferencial exploratória

FTIR – espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

GRP – glicerol residual

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

MM – meio mineral

NB – caldo nutriente

NP – nitroprussiato

NTA – ácido nitrilotriacético

OD – oxigênio dissolvido

P(3HB) – poli(3-hidroxi-butirato)

P(3HB-co-3HHx) – poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-hexanoatos)

P(3HB-co-3HV) – poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato)

P(3HB-co-4HB) – poli(3-hidroxi-butirato-co-4-hidroxi-buirato)

P(4HB) – poli(4-hidroxi-butirato)

PG – glicerol puro

Pg_{P(3HB)} – produtividade global em polímero (g L⁻¹ h⁻¹)

PHA-MCL – polihidroxi-alcanoato de cadeia média

PHAs – polihidroxi-alcanoatos

PHA-SCL – polihidroxi-alcanoato de cadeia curta

pO₂ – pressão parcial de oxigênio dissolvido

P_{P(3HB)prod} – produtividade em polímero na fase de produção

P_{Xr} – produtividade global em célula ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)

RMN – ressonância magnética nuclear

SG – experimento realizado sem adição de glicerol

T_g – temperatura de transição vítrea ($^{\circ}\text{C}$)

TGA – análise termogravimétrica

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

$T_{m\acute{a}x}$ – temperatura máxima de degradação ($^{\circ}\text{C}$)

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

vvm – volume de ar por volume de meio, por minuto

X_r – biomassa residual (g L^{-1})

X_t – biomassa total (g L^{-1})

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

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

α_c – grau de cristalinidade (%)

ΔH_m – entalpia de fusão (J g^{-1})

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

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações	xiii
INTRODUÇÃO	17
1 OBJETIVOS	20
1.1 Objetivo geral	20
1.2 Objetivos específicos.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Polihidroxicanoatos (PHAs)	21
2.1.1 Poli(3-hidroxi butirato)	23
2.2 Micro-organismo: <i>Cupriavidus necator</i>	24
2.3 Glicerol	28
2.4 Técnicas de caracterização de polímeros	32
2.4.1 Métodos espectroscópicos	32
2.4.1.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	32
2.4.1.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)	33
2.4.2 Análises térmicas	34
2.4.2.1 Análise termogravimétrica (TGA)	34
2.4.2.2 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)	35
3 ESTADO DA ARTE NA PRODUÇÃO DE PHA's	37
4 METODOLOGIA	44
4.1 Micro-organismo	44
4.2 Meio de cultivo	44
4.3 Condições de cultivo	46
4.3.1 Ensaio em biorreator	46
4.3.1.1 Alimentação em substrato	47
4.3.1.2 Alimentação em nitrogênio	47
4.3.1.3 Alimentação em meio mineral	48
4.4 Biomassa	48

4.5 Determinação da concentração de P(3HB)	48
4.5.1 Metanólise	49
4.5.2 Cromatografia gasosa	49
4.6 Determinação da concentração de substrato	49
4.6.1 Açúcares redutores	49
4.6.2 Glicerol	50
4.7 Nitrogênio	50
4.8 Metodologia utilizada para determinação dos parâmetros cinéticos	52
4.8.1 Fatores de conversão.....	52
4.8.2 Produtividade em células	52
4.8.3 Produtividades em P(3HB)	53
4.8.4 Velocidade específica máxima de crescimento celular	53
4.9 Extração de PHA	54
4.10 Caracterização	55
4.10.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	55
4.10.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H).....	55
4.10.3 Análise termogravimétrica (TGA)	55
4.10.4 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 Ensaios em biorreator	57
5.2 Caracterização	68
5.2.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	68
5.2.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H)	69
5.2.3 Análise termogravimétrica (TGA)	72
5.2.4 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)	74
CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	79
ANEXO A – Curva padrão para determinação da concentração de açúcares redutores	90
Anexo B – Evolução da concentração de nitrogênio	91
Anexo C – Gráficos de consumo de substrato	92
Anexo D – Análise estatística dos parâmetros cinéticos	93

INTRODUÇÃO

A elevada utilização de plásticos de origem petroquímica tem causado problemas ambientais, uma vez que esses materiais poliméricos, além de serem derivados de um recurso não renovável, apresentam longo tempo de degradação quando depositados no meio ambiente. Polímeros biodegradáveis vêm sendo pesquisados como alternativa a estes problemas, pois possuem propriedades que se assemelham aos de origem petroquímica, além de serem degradados no solo pela ação de micro-organismos em poucos meses, sendo transformados em água e gás carbônico (PRAZERES *et al.*, 2007).

Uma classe de polímeros produzidos por via bacteriana que vem se destacando são os polihidroxialcanoatos (PHAs). O termo PHA constitui uma classe de poliésteres que são produzidos por diversas bactérias e acumulados na forma de grânulos intracelulares de reserva de carbono, energia e equivalentes redutores (SILVA e GOMEZ, 2007). Os micro-organismos incluem *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida*, *Aeromonas hydrophila*, *Cupriavidus necator* e muitos outros, sob condições desbalanceadas de crescimento, com limitação de elementos nutricionais tais como fósforo, nitrogênio, magnésio e oxigênio na presença de excesso de carbono.

Os PHAs produzidos por micro-organismos podem ser divididos em três classes: PHAs de cadeia curta (PHA-SCL), contendo 3-5 átomos de carbono por monômero; PHAs de cadeia média (PHA-MCL), polímeros constituídos por 6-14 átomos de carbono e copolímeros contendo combinações dos monômeros de PHA-SCL e PHA-MCL, que são conhecidos como PHAs de cadeia mista (WONG *et al.*, 2012). Devido às suas propriedades os PHAs têm grande potencial de aplicação, desde embalagens de alimentos, para usos agrícolas e médicos, como ortopédicos (parafusos, suportes para engenharia de cartilagem, substitutos ósseos), para os dispositivos do sistema cardiovascular (substitutos dos vasos sanguíneos, válvulas cardíacas), tratamento de feridas (substitutos de pele, suturas, curativos, pós finos), nano e microesferas para libertação controlada de fármacos e outros (CAVALHEIRO *et al.*, 2012; LEONG *et al.*, 2014). Os PHAs podem apresentar uma vasta gama de propriedades que vão desde materiais rígidos, como o poli(3-hidroxibutirato) - P(3HB), que é um PHA-SCL; bem como materiais flexíveis, como os PHAs de cadeia média (TACIRO, 2008).

O P(3HB), polihidroxicanoato mais comumente estudado (CAVALHEIRO *et al.*, 2012), possui propriedades que se assemelham às do polipropileno (poliéster de origem petroquímica). No entanto suas aplicações são limitadas, pois trata-se de um material rígido e quebradiço (SCHNEIDER, 2006), que apresenta também maior grau de cristalinidade em relação aos copolímeros de PHAs. Por outro lado, os polímeros de cadeia média (PHA-MCL) são mais viscosos, elásticos e amorfos (WONG *et al.*, 2012). Além do P(3HB), estudos têm sido realizados para a produção de diferentes copolímeros, como poli(3-hidroxiбутирато-co-4-hidroxiбутирато) - P(3HB-co-4HB) (CAVALHEIRO, 2012); poli(3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxiуалерато) - P(3HB-co-3HV) (GARCÍA *et al.*, 2013) e poli(3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxiуексаноато) - P(3HB-co-3HHx) (WONG *et al.*, 2012). As diferentes propriedades físicas e mecânicas do polímero dependem dos tipos e quantidades de unidades de monoméricas incorporadas (WONG *et al.*, 2012). O copolímero P(3HB-co-4HB), por exemplo, altera a propriedade física do polímero de altamente cristalino para elastômero. Além disso, a temperatura de fusão (T_m) e a temperatura de transição vítrea (T_g) do P(3HB-co-4HB) podem ser alteradas pela composição de 4HB, tanto a T_g quanto a T_m serão diminuídas com a presença de frações mais altas de 4HB no copolímero (CHAI *et al.*, 2009).

Os micro-organismos sintetizam diferentes poliésteres, compostos de vários tipos de monômeros dependendo das condições de cultivo e das fontes de carbono (CHAI *et al.*, 2009). *Cupriavidus necator* é a bactéria mais estudada para a produção de P(3HB), enquanto que as bactérias do gênero *Pseudomonas* são as mais utilizadas para a produção de PHA-MCL (VIEGAS, 2005). Os substratos oleoginosos, como os óleos vegetais, são excelentes fontes de carbono tanto para o crescimento quanto para a biossíntese de PHAs (SCHNEIDER, 2006). Os óleos vegetais também são interessantes do ponto de vista industrial em razão do baixo custo e por apresentarem alto conteúdo em carbono por massa, o que eleva o rendimento teórico de PHAs quando comparado a outras fontes de carbono (VANZIN, 2008).

Diante deste contexto, a presente proposta tem como objetivo a produção de polihidroxicanoatos de cadeia curta (PHA-SCL) a partir de *Cupriavidus necator* tendo como substrato açúcar invertido visando estimular a fase de crescimento celular, e como cosubstrato indutor glicerol a fim de avaliar a sua influência sobre os

parâmetros cinéticos de cultivo, bem como caracterizar os filmes obtidos quanto às suas propriedades térmicas e físico-químicas.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Estudar a influência do uso de glicerol como cosubstrato na indução da produção de poli(3-hidroxi-butirato) por *Cupriavidus necator* tendo açúcar invertido como substrato.

1.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a cinética de crescimento e produção de P(3HB) em biorreator por *Cupriavidus necator* em processo descontínuo alimentado tendo apenas açúcar invertido como substrato;
2. Observar a influência da adição de glicerol (sobre os parâmetros cinéticos) como cosubstrato na fase de produção de P(3HB) em biorreator por *Cupriavidus necator* em processo descontínuo alimentado;
3. Avaliar a influência da adição de glicerol (sobre os parâmetros cinéticos) como cosubstrato durante as fases de crescimento celular e produção de P(3HB) em biorreator por *Cupriavidus necator* em processo descontínuo alimentado;
4. Caracterizar os polímeros obtidos quanto as suas propriedades térmicas e físico-químicas (TGA, DSC, FTIR).

2 REVISÃO DA LITERATURA

Os plásticos de origem petroquímica apresentam uma velocidade de biodegradação extremamente lenta, causando graves problemas ambientais, devido às quantidades crescentes de resíduos plásticos que se acumulam no meio ambiente. Uma alternativa seria a substituição dos polímeros convencionais por polímeros biodegradáveis. Os polihidroxicanoatos (PHAs) têm recebido muita atenção em função de sua similaridade com os plásticos convencionais e sua completa biodegradabilidade. Estudos vêm sendo realizados para a produção de polímeros biodegradáveis a partir de fontes renováveis de carbono. O glicerol, principal subproduto da produção de biodiesel, que vem aumentando significativamente nos últimos anos devido ao uso de biocombustíveis, é uma fonte de carbono atrativa para a síntese microbiana de polímeros.

2.1 Polihidroxicanoatos (PHAs)

O termo polihidroxicanoato (PHA) constitui uma classe de poliésteres produzidos por diversas bactérias e acumulados na forma de grânulos intracelulares de reserva de carbono, energia e equivalentes redutores (SILVA e GOMEZ, 2007), que são completamente degradados em água e dióxido de carbono sob condições aeróbicas e a metano sob condições anaeróbicas, por micro-organismos no solo, no mar e na água (KHANNA E SRIVASTAVA, 2005). Os PHAs são poliésteres alifáticos, também denominados biopolímeros ou bioplásticos, que possuem uma grande variação em suas propriedades, pois vão desde materiais rígidos e quebradiços a plásticos com boas propriedades de impacto ou até elastômeros resistentes, dependendo do tamanho dos grupos alquila ramificados e da composição do polímero (FRANCHETTI e MARCONATO, 2006). Os PHAs são poliésteres alifáticos formados por carbono, oxigênio e hidrogênio, cuja fórmula estrutural está representada na Figura 1 (GOMEZ & BUENO NETTO, 1997; TACIRO, 2008). Algumas unidades monoméricas constituintes de PHA podem ser observadas na Tabela 1 (LEE, 1996a).

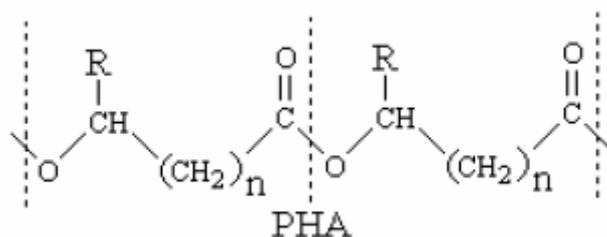


Figura 1. Fórmula estrutural dos polihidroxiálcanoatos (PHAs)

Tabela 1. Alguns representantes das famílias dos PHAs.

n=1	R = hidrogênio R= metil R= etil R = propil R = pentil R= nonil	Poli(3-hidroxiopropanato) Poli(3-hidroxiбутирато) Poli(3-hidroxiуalerato) Poli(3-hidroxihexanoato) Poli(3-hidroxiocetanoato) Poli(3-hidroxiodecanoato)
n=2	R = hidrogênio R= metil	Poli(4-hidroxiбутирато) Poli(4-hidroxiуalerato)
n=3	R = hidrogênio R= metil	Poli(5-hidroxiуalerato) Poli(5-hidroxihexanoato)
n=4	R = hexil	Poli(6-hidroxiodecanoato)

Fonte: Lee, 1996a

Os micro-organismos sintetizam diferentes PHAs, compostos de vários tipos de monômeros, sendo que a composição do monômero do PHA determina as propriedades físicas e químicas do polímero. Esta composição depende das condições de cultivo, da fonte de carbono, da rota metabólica e da especificidade da enzima do sistema de síntese (CHAI *et al.*, 2009; REHM & STEINBÜCHEL, 1999; SUDESH *et al.*, 2000).

As bactérias utilizadas para a produção de PHAs podem ser divididas em dois grupos com base em suas condições de cultura. No primeiro grupo a síntese ocorre quando a fonte de carbono é fornecida em excesso e há limitação de pelo menos um nutriente necessário à multiplicação das células (nitrogênio, fósforo, magnésio, ferro, potássio, etc.); algumas destas cepas bacterianas são *Bacillus megaterium*, *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas extorquens*, e *Pseudomonas oleovorans*. No segundo grupo a limitação de nutrientes não é necessária e o polímero pode ser acumulado durante a fase de crescimento, alguns exemplos são a *Escherichia coli* recombinante, *Azotobacter vinelandii* recombinante, e *Alcaligenes latus* (SILVA e GOMEZ, 2007; POSADA *et al.*, 2011).

Os PHAs produzidos por micro-organismos podem ser divididos em três classes: PHA de cadeia curta (PHA-SCL), contendo 3-5 átomos de carbono por monômero; PHA de cadeia média (PHA-MCL), polímeros constituídos por 6-14 átomos de carbono; e copolímeros contendo combinações dos monômeros de PHA-SCL e PHA-MCL, que são conhecidos como PHAs de cadeia mista (WONG *et al.*, 2012).

Uma das principais metas para o desenvolvimento de processos biotecnológicos é maximizar a produtividade, a fim de obter maior concentração dos produtos de interesse em um volume de reação, dentro do menor espaço de tempo. A produção de PHAs geralmente ocorre em fermentação submersa conduzida em processos de batelada, batelada alimentada ou de forma contínua (APATI, 2013; IENCZAK *et al.*, 2013).

2.1.1 Poli(3-hidroxibutirato)

O poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)) foi o primeiro PHA a ser descoberto sendo o polímero mais amplamente estudado da família de PHAs (KHANNA E SRIVASTAVA, 2005). O P(3HB) é um poliéster natural e biodegradável, produzido e acumulado como reserva energética na forma de grânulos por inúmeros micro-organismos com predomínio no uso da bactéria *Ralstonia eutropha* (atualmente *Cupriavidus necator*), quando submetidas a condições limitantes durante o crescimento (REDDY *et al.*, 2003).

A família de PHAs exibe uma grande variedade de propriedades mecânicas que vão de polímeros altamente cristalinos a elásticos, dependendo da composição da unidade monomérica, que ampliam suas áreas de aplicações (KHANA & SRIVASTAVA, 2005).

As aplicações dos PHAs em geral estão diretamente ligadas às propriedades específicas desses polímeros. Todos os PHAs compartilham algumas propriedades que os recomendam para determinadas aplicações e os tornam interessantes para a indústria (FORMOLO *et al.*, 2003).

No entanto, as propriedades mecânicas do P(3HB) limitam suas aplicações, pois trata-se de um homopolímero altamente cristalino, rígido e quebradiço (NONATO *et al.*, 2001). A cristalinidade de um polímero pode ser considerada como um “arranjo ordenado”, uma repetição regular de estruturas atômicas moleculares. O

P(3HB) apresenta todos os seus átomos de carbono ligados assimetricamente, possuindo cristalinidade variando entre 55 a 80 % e como consequência é quebradiço ao menor toque (LEE, 1996b). Já o módulo de elasticidade de um polímero está diretamente relacionado à sua rigidez ou flexibilidade, de forma que, quanto mais alto o módulo, maior a rigidez do polímero. O P(3HB) apresenta um módulo de elasticidade de aproximadamente 3,5 GPa, em contraste o poli(4-hidroxi-butirato) ((P(4HB))), um material altamente dúctil e flexível, apresenta módulo de elasticidade de ~ 0,15 GPa (Larrañaga *et al.*, 2014).

O P(3HB) apresenta características similares ao polipropileno (PP). Ambos fundem a temperaturas muito próximas, 180 °C para o P(3HB) e 174 °C para o PP. Os valores de temperatura de transição vítrea (Tg) dos dois polímeros indicam que o PP, por possuir Tg = -17 °C mostra-se mais flexível que o P(3HB) (Tg = 5 °C). A maior flexibilidade do PP em relação ao P(3HB) é confirmada pelo módulo de elasticidade do PP (1700 MPa), que é inferior ao do P(3HB) (3500 MPa) (FORMOLO *et al.*, 2003).

Na indústria, o uso de P(3HB) está centrado em produtos de rápido descarte, como barbeadores, embalagens de cosméticos, copos e talheres plásticos (CALVÃO *et al.*, 2009). O P(3HB) também pode ser utilizado na produção de sacos e vasilhames para fertilizantes e defensivos agrícolas, vasos para mudas e produtos injetados, como brinquedos e material escolar. Além disso, por ser biocompatível e facilmente absorvido pelo organismo humano, pode ser empregado na área médico-farmacêutica para a fabricação de fios de sutura, próteses ósseas e cápsulas que liberam gradualmente medicamentos na corrente sanguínea (VASCONCELOS, 2002).

2.2 Micro-organismo: *Cupriavidus necator*

Existem mais de 300 micro-organismos capazes de sintetizar PHA, no entanto apenas alguns estão sendo utilizados para a produção de polímeros, pois estes são capazes de acumular PHA de maneira eficiente para produção em escala industrial. Dentre essas bactérias estão *Cupriavidus necator*, *Methylobacterium organophilum*, *Pseudomonas olovorans*, *Alcaligenes latus*, *Protomonas extorquens*, *Azotobacter vinelandii*, *Paracoccus denitrificans* e *Escherichia coli* recombinante (LEONG *et al.*, 2014).

Cupriavidus necator é um micro-organismo procariótico, do tipo gram-negativo, encontrado naturalmente no solo e na água. Essa espécie apresenta células na forma de bastonete, é móvel e possui de 1 a 4 flagelos peritríquios. As células podem tornar-se esféricas na fase estacionária de crescimento (MARANGONI, 2000). A Figura 2 apresenta a bactéria em fase de crescimento (a) e em fase de acúmulo de polímero (b) (SQUIO, 2003).

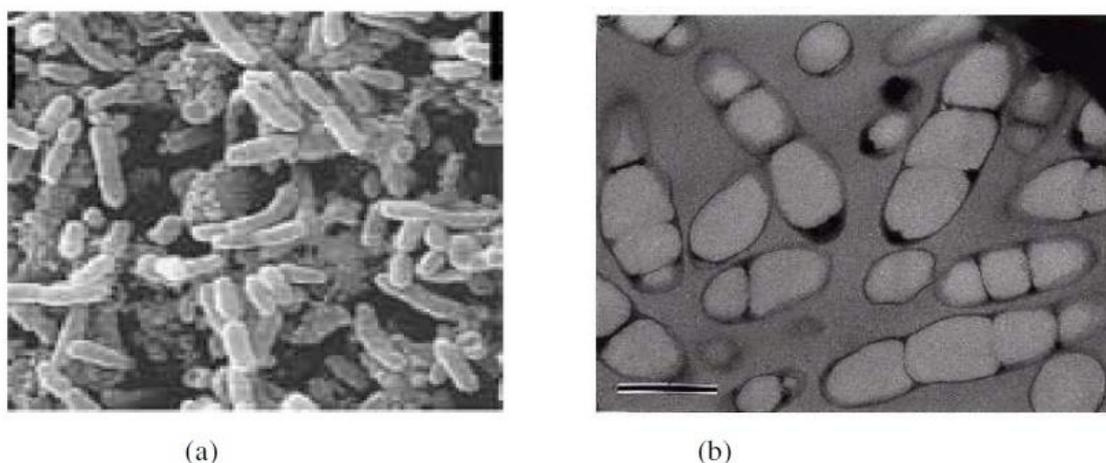


Figura 2. *Cupriavidus necator*: (a) na fase de crescimento e (b) fase de acúmulo do polímero

A bactéria é capaz de crescer em condições de quimiolitotrofia ou heterotrofia (REUTZ *et al.*, 1982). A quimiolitotrofia é a capacidade que os micro-organismos têm de utilizar os compostos inorgânicos como doadores de elétrons e o dióxido de carbono como fonte de carbono. A heterotrofia é a capacidade de utilizar compostos orgânicos como fonte de carbono e energia (DOELLE, 1975).

O acúmulo de PHA, na forma de grânulos, em *C. necator* geralmente ocorre quando existe excesso de fonte de carbono e limitação de algum nutriente essencial à multiplicação das bactérias. Trata-se de uma síntese que 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. Inversamente, na segunda etapa, interrompe-se o crescimento celular e estimula-se ao máximo o acúmulo de polímero nas células (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997). *Cupriavidus necator* sintetiza diferentes poliésteres, compostos de vários tipos de monômeros dependendo das condições de fermentação e das fontes de carbono (CHAI *et al.*, 2009), sendo capaz de produzir PHA a partir de fontes de carbono

variadas, tais como glicerol (CAVALHEIRO *et al.*, 2012), óleos vegetais (FUKUI e DOI, 1998; WONG *et al.*, 2012), e mais recentemente, a partir de um efluente rico em ácido graxo obtido da produção de azeite de oliva (MARTINEZ *et al.*, 2015).

Em condições de crescimento balanceado, *Cupriavidus necator* cataboliza carboidratos, pela via Entner-Doudoroff, a piruvato, que pode então ser convertido, através de desidrogenação, a acetil-CoA. Durante o crescimento reprodutivo, a acetil-CoA entra no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) com a liberação da coenzima A (CoASH) e é terminalmente oxidado a CO₂ gerando energia, na forma de ATP, equivalentes redutores (NADH, NADPH e FADH₂) e precursores biossintéticos (2-oxoglutarato, oxaloacetato) (BRAUNEGG *et al.*, 1998). Em condições balanceadas do meio, como visto anteriormente, o acetil-CoA segue pelo TCA gerando energia e material celular. Por outro lado, em condições de excesso de carbono e limitação de algum nutriente essencial, o acetil-CoA entra na via de biossíntese de P(3HB) (DALCANTON, 2006).

A biossíntese de P(3HB) em *C. necator*, e em muitos microrganismos, ocorre 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, conforme Figura 3. A enzima 3-β-cetotiolase condensa, reversivelmente, 2 moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA. A enzima acetoacetil-CoA redutase, por sua vez, reduz esse substrato a D(-)-3-hidroxiacil-CoA, que é incorporado à cadeia de polímero pela ação da PHA sintase (LEE, 1996b).

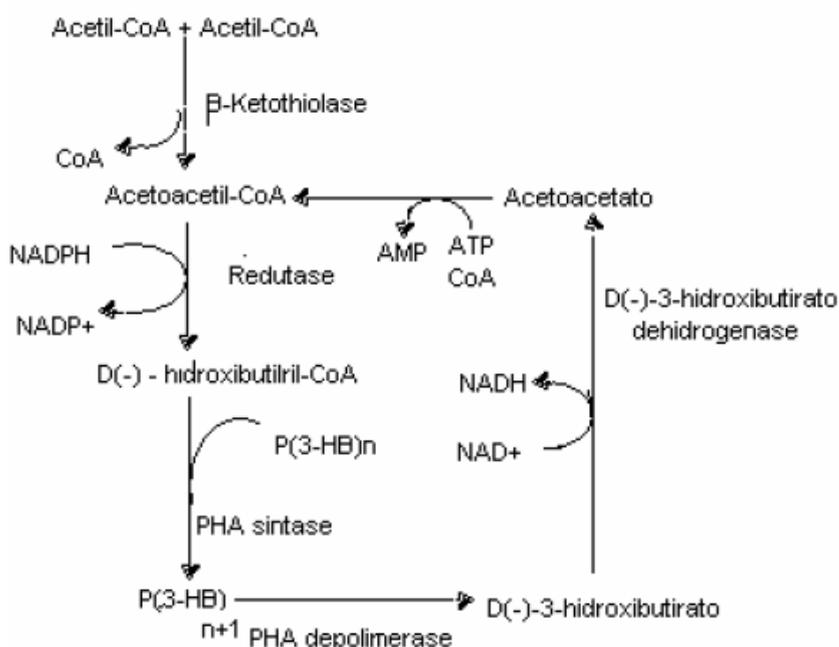


Figura 3. Rota metabólica da síntese e degradação de poli(3-hidroxi-butarato) em *C. necator* (Lee, 1996b).

A síntese de P(3HB) é regulada em nível enzimático, sendo que as concentrações intracelulares de acetil-CoA e coenzima A livre exercem papel principal nessa regulação. Uma alta concentração de acetil-CoA é necessária para a síntese do polímero. Entretanto, a alta concentração de CoA livre, liberada quando o acetil-CoA entra no TCA, inibe a ação da 3- β -cetotiolase inibindo dessa forma a síntese do polímero. Por outro lado, a síntese de P(3HB) é estimulada pela alta concentração intracelular da enzima NADPH e pela alta razão NADPH/NADP obtidas em condições de limitação de nutrientes (SQUIO, 2003).

A limitação nutricional para produção de P(3HB) pode ser em oxigênio, nitrogênio, fosfato, entre outros, como já visto anteriormente. A limitação em oxigênio aumenta a relação NADH/NAD⁺ por não existir o aceptor final de elétrons na cadeia respiratória, levando à formação de P(3HB). Sob limitação em nitrogênio, as células não produzem mais proteínas e ocorre acúmulo de ATP. O excesso de ATP's provoca diminuição da fosforilação oxidativa, e assim, acúmulo das coenzimas reduzidas (NADH), que levam à formação de P(3HB), cuja via metabólica reoxida estas coenzimas (DALCANTON, 2006). O fosfato é um componente vital para muitas estruturas celulares como ácidos nucleicos e fosfolípidos, além de

estar envolvido em energética celular. O magnésio, por sua vez, é essencial para o crescimento da célula e tem várias funções como manter a integridade dos ribossomos, participar do mecanismo de controle de permeabilidade das membranas da célula, além de ser co-fator em muitas reações enzimáticas (ASENJO *et al.*, 1995). Dessa forma, as condições necessárias para a síntese dos PHA's são a elevada concentração de NADPH, a baixa concentração de CoA e a elevada concentração de acetil- CoA (SQUIO, 2003).

Os PHAs sintetizados por *C. necator* incluem monômeros de 3-hidroxicvalerato (3HV), 3-hidroxiacetato (3HB), 4-hidroxiacetato (4HB), 5-hidroxicvalerato (5HV) (REE *et al.*, 1992). Os óleos vegetais são interessantes do ponto de vista industrial em razão do baixo custo e por apresentarem alto conteúdo em carbono por massa, o que eleva o rendimento teórico de PHA quando comparado a outras fontes de carbono (VANZIN, 2008).

2.3 Glicerol

Quimicamente o glicerol é um tri-álcool com 3 carbonos, tendo como nome sistemático (IUPAC) 1,2,3-propanotriol (Figura 4). É um líquido incolor, com gosto adocicado, sem cheiro e muito viscoso, derivado de fontes naturais ou petroquímica (BEATRIZ *et al.*, 2011). O glicerol foi primeiramente descoberto em 1779 por Scheele, pelo aquecimento de uma mistura de óxido de chumbo com azeite de oliva. Na época, ele o batizou de “o doce princípio das gorduras” (MOTA *et al.*, 2009).

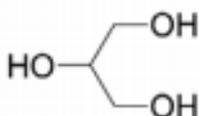


Figura 4. Estrutura do glicerol

Fonte: BEATRIZ, 2011.

O glicerol pode ser produzido por fermentação microbiana ou por síntese química a partir de matérias-primas petroquímicas. Ele também pode ser recuperado a partir de fabricação de sabão. No processo tradicional do último, o glicerol é liberado como um subproduto durante a hidrólise de gorduras, no entanto este

processo atualmente é de pequena importância, uma vez que o sabão tem sido largamente substituído por detergentes (WANG, 2001).

O termo glicerol aplica-se somente ao componente químico puro 1,2,3-propanotriol. O termo glicerina aplica-se aos produtos comerciais purificados, normalmente, contendo pelo menos 95% de glicerol. Vários níveis e designações de glicerina estão disponíveis comercialmente. Estes diferem um pouco em seu conteúdo de glicerol e em outras características, tais como cor, odor e impurezas. A glicerina bruta é definida como a glicerina separada do biodiesel, sem sofrer qualquer tipo de purificação. A chamada glicerina loira é normalmente utilizada para designar a glicerina oriunda dos processos de produção de biodiesel, onde a fase glicerínica sofreu um tratamento ácido para neutralização do catalisador e remoção de ácidos graxos eventualmente formados no processo. Em geral, esta glicerina contém cerca de 80% de glicerol, além de água, metanol e sais dissolvidos (DALL'ALBA, 2009).

O volume de glicerina, principal subproduto de plantas de produção de biodiesel, tem crescido exponencialmente ao longo dos últimos anos devido à ascensão do uso de biocombustíveis, uma vez que a disponibilidade de petróleo é claramente limitada. O biodiesel é uma alternativa aos combustíveis derivados do petróleo. Fabricado a partir de fontes renováveis (óleo de soja, gordura animal, óleo de algodão) é um combustível que emite menos poluentes que o diesel e pode ser usado em carros e qualquer outro veículo com motor diesel (BIODIESELBR^a, 2014, web).

A lei brasileira 11097/05 previa que a utilização de misturas de até 20% (B5-B20) de biodiesel ao óleo diesel se tornassem obrigatórias até 2013 (RINALDI, 2007), no entanto esse percentual atingiu 7% em novembro de 2014 (PORTAL BRASIL, 2014, web). Do ponto de vista químico, o óleo vegetal usado na produção de biodiesel é um triglicerídeo, ou seja, um triéster derivado do glicerina. Sob ação de um catalisador básico e na presença de metanol ou etanol, o óleo sofre uma transesterificação formando três moléculas de ésteres metílicos ou etílicos dos ácidos graxos, que constituem o biodiesel em sua essência, e liberando uma molécula de glicerina. Para cada 90 m³ de biodiesel produzidos por transesterificação são gerados, aproximadamente, 10 m³ de glicerina, o que reforça a necessidade de se encontrar utilizações comerciais para este coproduto do biodiesel (MOTA *et al.*, 2009).

Com o avanço do programa nacional do biodiesel – em 2011 foram fabricados 2,6 bilhões de litros do biocombustível e a produção estimada para 2020 é de 14,3 bilhões de litros –, o volume gerado de glicerina é enorme e muito acima da demanda. Em 2011, cerca de 260 mil toneladas de glicerina foram geradas apenas como subproduto do biodiesel, volume quase oito vezes superior à demanda, estimada em cerca de 40 mil toneladas (BIODIESELBR^b, web, 2014). A glicerina é utilizada na indústria farmacêutica na composição de cápsulas, supositórios, anestésicos, xaropes, antibióticos e antissépticos. É aplicada como emoliente e umectante em cremes dentais, hidratantes para a pele, loções pós-barba, desodorantes, batons e maquiagens. Amacia e aumenta a flexibilidade das fibras têxteis. É empregada no processamento de tabaco, na composição dos filtros de cigarro e como veículo de aromas. É utilizada também, como lubrificantes de máquinas processadoras de alimentos, na fabricação de tintas e resinas, na fabricação de dinamites, etc. No entanto, para que a glicerina possa ter essa gama de aplicações, a mesma necessita de um tratamento prévio, onde todo o álcool utilizado na transesterificação é retirado através de destilação da glicerina e a mesma, ainda, é submetida a um tratamento ácido para retirada dos sais de catalisador também oriundo da produção do biodiesel (MENDES & SERRA, 2012). Somente depois de purificada a glicerina pode ser utilizada na área de química fina e no setor alimentício (LARSEN, 2009). Os setores industriais vinculados aos segmentos alimentícios, farmacêuticos e de cosméticos são os principais mercados consumidores do glicerol (com pureza acima de 95%) e dos seus derivados. As principais aplicações o glicerol estão ilustradas na Figura 5 (UMPIERRE & MACHADO, 2013).

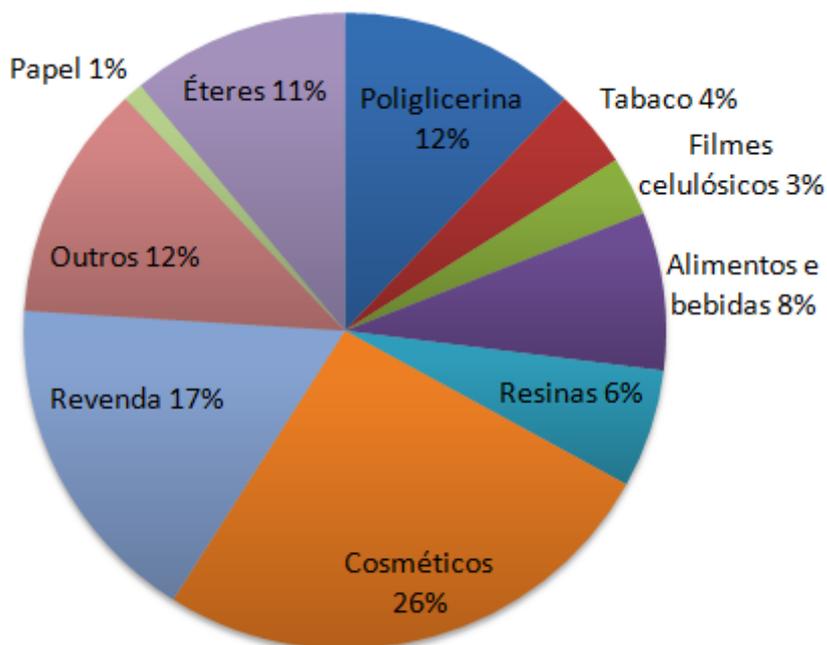


Figura 5. Tendência dos principais mercados consumidores de glicerol e seus derivados
 Fonte: Adaptado de UMPIERRE & MACHADO, 2013.

A partir dos anos 1970 até os últimos anos, o glicerol de alta pureza tinha um preço bastante estável variando de cerca de US\$ 1200 a US\$ 1800 por tonelada. Isto foi baseado em mercados estáveis e produção. No entanto, este mercado relativamente estável foi drasticamente alterado pela chegada de biodiesel. Quantidades crescentes de glicerol começaram a ser despejadas em um mercado relativamente inflexível, e em 2005 os preços já estavam em queda livre. Neste mesmo ano a demanda mundial total de glicerol foi estimada em 900 mil toneladas. Até 2003, os preços de glicerol foram cerca de US\$ 1200 por tonelada, mas em 2006 os preços já estavam em torno de US\$ 600 por tonelada (HGCA, 2006). No início de 2012, o preço do glicerol começou a se recuperar, com valores variando entre US\$ 838-1014/t nos EUA e US\$ 700-780/t na Ásia; a partir da boa demanda global através de diversas utilizações, particularmente em aplicações de qualidade alimentar e farmacêutica (CIRIMINNA *et al.*, 2014).

A glicerina resultante da fabricação do biodiesel (glicerina bruta vegetal) apresenta cerca de 20% de impurezas. As principais impurezas presentes na glicerina do biodiesel são catalisador, álcool, ácidos graxos, sais e água. Estas impurezas dependem do tipo da oleaginosa e do tipo de catálise empregada na produção do biodiesel. Dependendo do grau de pureza, a diferença no preço do

produto é significativa. A cotação da glicerina bruta, em 2008, estava em torno de R\$ 105,00/t, a bidestilada (96%) era de R\$ 2.100,00 por tonelada, enquanto que a glicerina farmacêutica (>99,5%) era comercializada por R\$ 2.500,00 por tonelada (BEATRIZ *et al.*, 2011).

2.4 Técnicas de caracterização de polímeros

De acordo com CAMPBELL & WHITE (1989), há muitos motivos para se caracterizar um material polimérico, como identificação de um material, design a nível molecular, microestrutural e de processo e controle de análises.

2.4.1 Métodos espectroscópicos

Muitas técnicas de caracterização têm o termo “espectroscopia” em seu nome, o qual especifica a medida da intensidade de absorção ou emissão de radiação eletromagnética, por uma amostra polimérica a ser analisada. Como por exemplo, a absorção do ultravioleta visível (UV visível) que atravessa um polímero: diferentes porções do espectro de radiação eletromagnética são absorvidas em diferentes graus dependendo da estrutura molecular da amostra. As medidas de absorção de comprimento de onda podem ser interpretadas em termos de estrutura molecular (CAMPBELL & WHITE, 1989).

2.4.1.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Na espectroscopia na região do infravermelho, a emissão ou absorção do espectro inicia quando as moléculas são submetidas a transições entre estados quânticos que correspondem a dois diferentes estados de energia interna. A diferença ΔE entre estes estados está relacionada com a frequência da radiação emitida ou absorvida por um quantum. Os comprimentos de onda da frequência de infravermelho são de 1-50 μm e são associados à vibração molecular e espectro de vibração de rotação (BILLMEYER, 1984).

O espectro de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é hoje um dos métodos mais rápidos para caracterizar os grupamentos funcionais de

um composto químico. O método se aplica tanto à análise qualitativa quanto à quantitativa, de sólidos, líquidos ou gases. As quantidades de analito usadas são muito pequenas (da ordem de mg ou fração); a amostra não é destruída no ensaio e pode, portanto, ser recuperada após a medida do espectro (COSTA NETO, 2004 *apud* SPIER, 2005).

A absorção do espectro de infravermelho em polímeros é diferente para a fase cristalina e a fase amorfa, isto pode ser devido ao fato de existirem conformações específicas em cada fase (BILLMEYER, 1984). As características mais importantes de um espectro no infravermelho são os valores das frequências de absorção da molécula (bandas), parâmetro fundamental para sua identificação ou para a interpretação do espectro, visando à caracterização de grupamentos funcionais nele presentes. O espectro de uma mistura será como uma mistura dos espectros dos compostos em separados (COSTA NETO, 2004 *apud* SPIER, 2005).

2.4.1.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)

A espectroscopia de Ressonância magnética nuclear (RMN) é basicamente outra forma de espectroscopia de absorção, semelhante à espectroscopia de infravermelho ou de ultravioleta, no entanto, a interpretação dos espectros de RMN pode ser feita com maior evidência do que no caso dos espectros de infravermelho ou ultravioleta (SILVERSTEIN, 1994). A espectroscopia de RMN é uma técnica que se fundamenta no registro da interação da radiofrequência com núcleos atômicos colocados sob influência de um campo magnético (RIBEIRO, 2008).

Quando sujeitos a um campo magnético intenso, alguns núcleos atômicos - como ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P , entre outros - são capazes de absorver a energia de determinada radiação eletromagnética. A espectroscopia de RMN analisa a frequência correspondente a esta energia (frequência de ressonância) e o tempo em que os núcleos (após irradiação) levam para voltar à temperatura ambiente. Este tempo de resfriamento é conhecido como tempo de relaxação (Princípios da Ressonância Magnética Nuclear e Aplicações em Frutas e Hortaliças, 2015, web).

Os núcleos atômicos que estão sujeitos a ambientes químicos e magnéticos diferentes absorvem energia em uma frequência específica e podem ser diferenciados dentro de uma mesma molécula. Da mesma forma, a movimentação

molecular e as interações com ambientes magnéticos distintos fazem com o tempo de relaxação entre os núcleos seja diferente. O tempo de relaxação fornece informações sobre a composição química e as propriedades físico-químicas da amostra (Princípios da Ressonância Magnética Nuclear e Aplicações em Frutas e Hortaliças, 2015, web).

2.4.2 Análises térmicas

As análises térmicas envolvem todos os métodos em que as propriedades medidas são obtidas a partir de mudanças na temperatura. A calorimetria diferencial exploratória (DSC) é especificamente designada para medidas das propriedades térmicas do material a ser examinado (por exemplo, mudanças de entropia ou entalpia, etc.). Outras técnicas como a análise termogravimétrica (TGA), como o próprio nome diz, simplesmente monitoram a perda de massa com o aumento da temperatura (CAMPBELL & WHITE, 1989).

A utilização de técnicas de análise térmica, como DSC e TGA, auxilia na observação das alterações nas propriedades do material antes e depois da degradação. A determinação das propriedades térmicas, tais como, o grau de cristalinidade obtido através da entalpia de fusão (ΔH_m), a temperatura de fusão (T_m) e a temperatura de transição vítrea (T_g) dos polímeros, são obtidas por DSC. A análise termogravimétrica (TGA) fornece as temperaturas de início de degradação (T_{onset}) e temperatura máxima de degradação (T_{max}), tornando possível avaliar a degradação térmica e a porcentagem de perda de massa dos polímeros (SPIER, 2005).

2.4.2.1 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica é definida como o estudo da mudança na massa em função da temperatura, tempo e/ou atmosfera. Para medir a mudança de massa o equipamento dispõe de uma balança sensível (SPIER, 2005).

A termogravimetria é uma técnica muito utilizada na caracterização do perfil de degradação de polímeros e outros materiais. A exposição à temperatura elevada pode, algumas vezes, alterar a estrutura química e, por consequência, as propriedades físicas dos materiais. Portanto, a curva de degradação térmica (Figura

6), em condições não isotérmicas, mostra o perfil da resistência ou estabilidade térmica que o material apresenta quando submetido a uma varredura de temperatura. A estabilidade térmica é definida como a capacidade da substância em manter suas propriedades o mais próximo possível de suas características iniciais, considerando o ambiente imposto ao material e as funções que ele deve executar (SPIER, 2005).

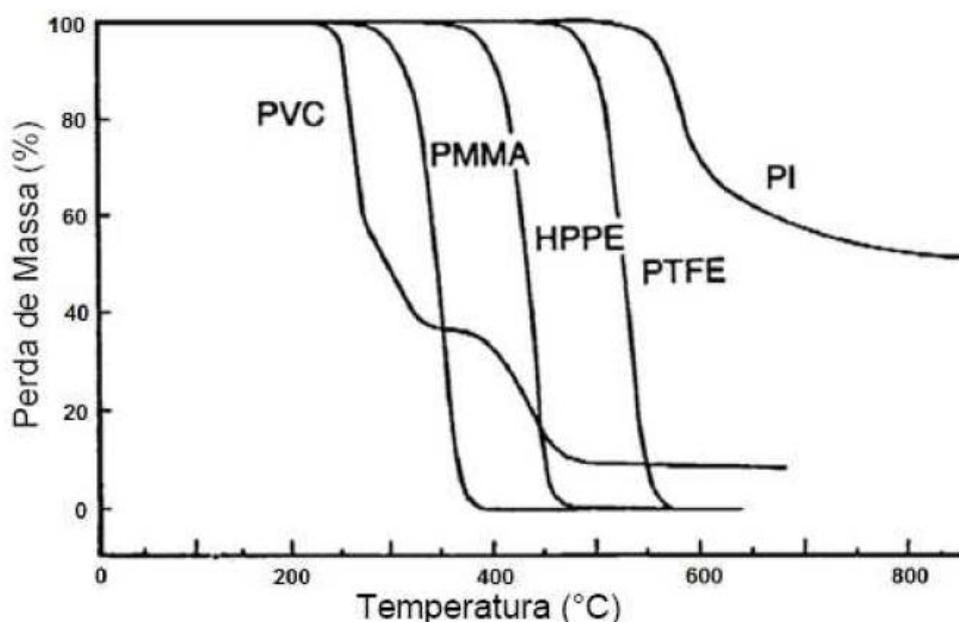


Figura 6. Exemplo de curvas termogravimétricas.

2.4.2.2 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

O DSC é uma técnica utilizada para determinar as entalpias dos processos de fusão e cristalização (endo e exotérmicos) por comparação com uma referência inerte. O equipamento geralmente varre linearmente uma faixa de temperatura a uma determinada taxa de aquecimento. No DSC do tipo fluxo de calor, a amostra e a referência são aquecidas pela mesma fonte de calor e a diferença de temperatura entre ambas é monitorada em função da temperatura ou do tempo (WENDLANDT & GALLAGHER, 1981). A cada momento em que a amostra passa por uma transição de estado térmico, um sinal é produzido e plotado em um gráfico, como demonstra a Figura 7 (BILLMEYER, 1984).

O DSC pode ser empregado na medição de temperaturas de transição vítrea, fusão e cristalização; na determinação da cristalinidade, da presença de moléculas de água ligadas, da influência de aditivos sobre as propriedades dos materiais resultantes (cargas, plastificantes, entre outros), na medição de calor específico, no estudo de reações de polimerização e de cura e, ainda, na avaliação da degradação térmica e oxidativa (SPIER, 2005)

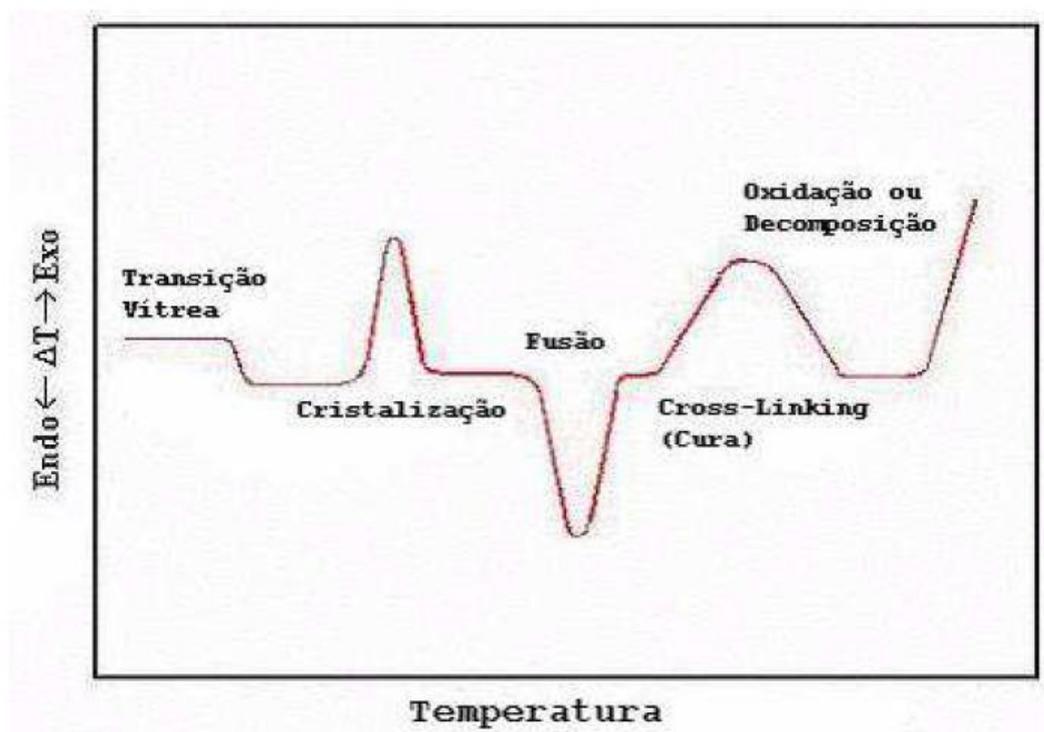


Figura 7. Apresentação de uma curva típica de DSC.

3 ESTADO DA ARTE NA PRODUÇÃO DE PHA's

Na Tabela 2 está apresentada uma síntese dos principais estudos realizados por alguns autores para a produção de PHAs por *Cupriavidus necator* utilizando glicerol como substrato.

Tabela 2. Resultados obtidos por alguns autores utilizando glicerol como fonte de carbono para a produção de PHA.

Micro-organismo	Processo	Substratos	Temperatura (°C)	PHA	% PHA	Referência
<i>C. necator</i> DSM 545	Batelada alimentada	Glicose	30	P(3HB)	76,2	[1]
		Glicerol residual			62,7	
<i>C. necator</i> DSM 545	Batelada	Glicerol residual	30	P(3HB-co-3HV)	46,3	[2]
<i>C. necator</i> DSM 545	Batelada alimentada	Glicerol residual	37	P(3HB)	70,9	[3]
<i>C. necator</i> DSM 545	Batelada	Açúcar invertido	38	P(3HB)	59,0	[4]
		Açúcar invertido e glicerol			56,1	
<i>C. necator</i> DSM 545	Batelada alimentada	Glicerol residual	34	P(3HB-co-4HB) P(3HB-4HB-3HV)	36,1 36,9	[5]
<i>C. necator</i> JMP 134	Batelada	Glicerol residual purificado	35	P(3HB)	62,4	[6]
<i>C. necator</i> DSM 545	Batelada alimentada	Glicerol puro	34	P(3HB)	62,0	[7]
		Glicerol residual			38,0	

[1] Mozunder *et al.*, 2014

[2] García *et al.*, 2013

[3] Spoljaric *et al.*, 2013

[4] Apati, 2012

[5] Cavalheiro *et al.*, 2012

[6] Posada *et al.*, 2011

[7] Cavalheiro *et al.*, 2009

Mozumder *et al.* (2014) desenvolveram uma estratégia de alimentação em batelada alimentada para a produção de P(3HB). O objetivo desse estudo foi otimizar um processo de fermentação descontínua com alimentação controlada do substrato para obter uma cultura de alta densidade celular com elevada produtividade e alto conteúdo de P(3HB). O micro-organismo utilizado foi *Cupriavidus necator* DSM 545. O nível de concentração de oxigênio dissolvido (OD) foi regulada a 55% de saturação de ar para a fase 1 (crescimento celular) e 30% de saturação de ar para a fase 2 (acúmulo de P(3HB)), o pH foi mantido a 6,80. A temperatura do processo foi fixada em 30 °C. Um programa de *software* baseado em computador, BioXpert, foi usado para implementar a estratégia de alimentação desenvolvida para controlar a concentração da fonte de carbono no fermentador no nível desejado. Neste estudo, dois tipos de estratégias de alimentação de glicose (a alimentação exponencial e a alimentação de substrato combinado), foram avaliados para manter a concentração de glicose dentro de um intervalo ideal. O efeito da concentração de glicose no crescimento de *C. necator* foi investigado previamente a partir do monitoramento da velocidade de crescimento inicial. O meio de fermentação foi suplementado com glicose em concentrações que variaram de 5 a 60 g L⁻¹. Os resultados indicaram que a concentração inicial de glicose afetou significativamente a velocidade de crescimento específico, que se verificou ideal a uma concentração de glicose inicial que varia entre 10 e 20 g L⁻¹, sendo que um decréscimo na velocidade de crescimento foi observado com concentrações mais elevadas de glicose. Os resultados apresentados demonstram que a melhor estratégia de alimentação consistiu em alimentação exponencial do substrato nas primeiras 10 h de cultivo, seguido de uma alimentação de substrato combinada com adição de meio básico nas horas subsequentes, até o final da fase de crescimento de biomassa. Depois de otimizar a estratégia de alimentação para o crescimento da biomassa, a síntese de P(3HB) foi provocada pela limitação de nitrogênio na presença de glicose, o que foi alcançado pela substituição de alimentação de NH₄OH para NaOH (para o controle de pH). Quando o nitrogênio foi limitado a uma concentração de biomassa residual de 49 g L⁻¹ a biomassa máxima (CDM) e concentração de P(3HB) foram 127,7 g L⁻¹ e 97 g L⁻¹, respectivamente, após 56 h, resultando num teor de 75,8 % de P(3HB) e produtividade de 1,74 g L⁻¹ h⁻¹. No total, 438 g (673 mL de solução de glicose a 65 %) glicose foi alimentado durante a fermentação, resultando em fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) de

0,22 g de P(3HB)/g de glicose. Ao aplicar a limitação de nitrogênio a uma concentração da biomassa residual de 56 g L^{-1} a concentração de biomassa máxima (CDM) foi de 164 g L^{-1} e a concentração de P(3HB) de 125 g L^{-1} após 62 h (o teor de P(3HB) e produtividade aumentaram para 76,2 % e $2,03 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Nesta experiência, 523 g de glicose (806 mL de solução de glicose a 65 %) foi adicionada, o que resultou em $Y_{P/S} = 0,24 \text{ g de P(3HB)/g de glicose}$. Em ambos os experimentos, a produção de P(3HB) atingiu o seu máximo de concentração 26 h após a mudança para a fase de acúmulo. Ao atrasar a limitação de nitrogênio até que a concentração da biomassa atingisse 62 g L^{-1} , o processo tornou-se instável devido à excessiva formação de espuma, que não podia ser controlada pela adição de anti-espumante. Para demonstrar que a estratégia de alimentação desenvolvida é independente da fonte de carbono utilizada, a estratégia de alimentação foi validada utilizando glicerol residual derivado de uma planta de biodiesel como única fonte de carbono para a produção de P(3HB). Para a cultura de batelada alimentada, realizou-se alimentação exponencial por um período de 10 h, seguido pela adição de meio alcalino usado para a fase de crescimento da biomassa. Após 30 h, a limitação de nitrogênio foi iniciada para provocar a biossíntese de P(3HB). A biomassa (CDM) e a concentração de P(3HB) obtido após 48 h foram de $104,7 \text{ g L}^{-1}$ e $65,6 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente, resultando num teor de 62,7 % de P(3HB). A produtividade máxima de P(3HB) foi de $1,36 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

García *et al.* (2013) avaliaram a utilização de glicerol bruto (subproduto da indústria do biodiesel) como substrato para o cultivo de poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) produzido por *Cupriavidus necator*. Os experimentos foram realizados em frascos de 250 mL (volume de 50 mL de meio) em um agitador orbital a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, com pH inicial na faixa de 6,7-6,9 e agitação de 180 min^{-1} . Cinco frascos agitados foram preparados com os meios de fermentação que continham farelo de colza hidrolisado (a estirpe industrial de *A. oryzae* isolada a partir de milho de soja foi utilizada em fermentações em estado sólido para produzir enzimas essenciais para a hidrólise da farinha de colza), concentração inicial de glicerol bruto de 25 g L^{-1} e concentrações iniciais de nitrogênio (livre de amônio) de 170, 240, 320, 400 e 460 mg L^{-1} . Os resultados mostram que o farelo de colza hidrolisado e o glicerol bruto levaram à produção de P(3HB-co-3HV), sem adição de precursores para a produção de monômero 3HV. O maior valor de fração molar de 3HV (8 %) foi obtido no experimento com menor concentração de nitrogênio (170 mg L^{-1}). No entanto, nessa

condição os valores de biomassa total ($5,1 \text{ g L}^{-1}$), concentração total de PHA ($1,4 \text{ g L}^{-1}$) e fração de PHA (27,4 %) foram os mais baixos. Esses valores aumentaram gradativamente com o aumento da concentração de nitrogênio. Para a concentração de nitrogênio de 460 mg L^{-1} foram obtidos $15,1 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa total, concentração de PHA de $7,0 \text{ g L}^{-1}$ e fração de PHA de 46,3 %, no entanto a fração molar do monômero 3HV foi de apenas 2,8 %. Posteriormente, foram realizados outros dois experimentos para a concentração de nitrogênio mais elevada, no entanto as concentrações iniciais de glicerol foram inferiores (9 e 16 g L^{-1}), uma vez que o glicerol leva à produção da fração 3HB. Concentrações decrescentes de glicerol resultaram na redução da biomassa total ($12,5$ e $8,2 \text{ g L}^{-1}$, para 16 e 9 g L^{-1} de glicerol respectivamente), concentração de PHA ($5,2$ e $3,1 \text{ g L}^{-1}$) e fração do polímero (41,6 e 37,8 %), no entanto a fração de 3HV foi ligeiramente superior, com valores de 3,2 % quando a concentração inicial de glicerol foi de 16 g L^{-1} e 3,5 % para concentração de 9 g L^{-1} . Os autores citam ainda que a produção de P(3HB-co-3HV) pode ter ocorrido devido à presença de diferentes aminoácidos no hidrolisado de colza. A proteína do farelo de colza contém predominantemente ácido glutâmico, enquanto que outros aminoácidos (por exemplo, treonina, metionina, isoleucina e valina) estão presentes em quantidades significativamente mais baixas e semelhantes. Steinbuchel e Lütke-Eversloh (2003) relataram que aminoácidos específicos, tais como a valina, isoleucina, treonina e metionina são precursores para a síntese de 3HV porque eles são catabolizados através propionil-CoA. Além disso, Yoon *et al.* (1995) relataram que pequenas quantidades de treonina, isoleucina e valina aumentaram a produção de 3HV durante a fermentação com *Alcaligenes sp.* SH-69, que foi identificado como um micro-organismo capaz de produzir o copolímero de P(3HB-co-3HV) a partir de fontes de carbono simples.

Spoljaric *et al.* (2013) investigaram as possibilidades de maximização da produção de P(3HB) por *Cupriavidus necator*, tendo glicerol como substrato, a partir de modelagem cinética. O cultivo em batelada alimentada foi conduzido em biorreator de 5L, em que o consumo de substrato foi monitorado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e adicionado glicerol quando necessário. Os parâmetros controlados foram pH ($7,1 \pm 0,1$), temperatura ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) e concentração de oxigênio dissolvido (40 % de saturação para a fase de crescimento e 20 % para a fase de produção). O processo de fermentação foi otimizado com cinco abordagens diferentes utilizando simulação matemática, com o objetivo de atingir a quantidade

máxima de P(3HB) e de conteúdo de P(3HB) em biomassa. A maior concentração final de P(3HB) ($62,36 \text{ g L}^{-1}$) foi atingida a partir da estratégia de alimentação de glicerol com fluxo contínuo ($0,015 \text{ L h}^{-1}$) quando a concentração de glicerol caiu abaixo de 5 g L^{-1} , nesta simulação o acúmulo de P(3HB) foi de 71,38 %, em 30h de fermentação. Quando o fluxo de alimentação de glicerol foi de $0,0224 \text{ L h}^{-1}$ (para a concentração de glicerol na fase de alimentação ficar entre $3-5 \text{ g L}^{-1}$) os valores de concentração de P(3HB) e acúmulo de P(3HB) foram $61,15 \text{ g L}^{-1}$ e 70,98 %, em 23h. Os resultados dessa simulação foram ligeiramente inferiores ao anterior, mas a vantagem deste tipo de fermentação foi o menor período de tempo total de fermentação. Para as duas condições o valor de biomassa residual foi de 25 g L^{-1} (quando a biomassa atingiu esse valor foi imposta uma limitação de oxigênio).

Apati (2012) avaliou a influência do uso de 15 g L^{-1} de glicerol purificado ou bruto (proveniente de processo de transesterificação de óleo de soja usado para obtenção de biodiesel) como cosubstrato na produção de P(3HB) por *Cupriavidus necator* utilizando 30 g L^{-1} de açúcar invertido (AI) como substrato, operando em biorreator de 2 L em processo de batelada, em que a temperatura e o pH foram mantidos em 7 e 38 °C, respectivamente. Os resultados demonstraram que produção e o acúmulo de P(3HB) para os ensaios realizados com adição de 30 g L^{-1} de AI (ensaio AI/SG; açúcar invertido/sem glicerol) ou com adição de 30 g L^{-1} de AI e 15 g L^{-1} de glicerol purificado como cosubstrato (ensaio AI/GP; açúcar invertido/glicerol purificado) foram muito semelhantes; $9,1 \text{ g L}^{-1}$ de P(3HB) e 56,1 % de acúmulo para o ensaio AI/GP e $9,4 \text{ g L}^{-1}$ de P(3HB) e 59,0 % de acúmulo para AI/SG. O fator de conversão de substrato em P(3HB) para estes ensaios foi de $0,47 \text{ g g}^{-1}$ para AI/GP e $0,51 \text{ g g}^{-1}$ para AI/SG. Para o ensaio em que utilizou-se 30 g L^{-1} de AI e glicerol bruto como cosubstrato na concentração de 15 g L^{-1} (ensaio AI/GB) a produção de P(3HB) foi de apenas $0,3 \text{ g L}^{-1}$. As baixas concentrações de biomassa e P(3HB) para esse ensaio foram atribuídas ao fato do glicerol não ter passado por nenhuma etapa de purificação e conter metanol e sais residuais provenientes da reação de transesterificação, fato também observado por Mothes *et al.* (2007), que utilizaram glicerol de diversas manufaturas de biodiesel da Alemanha na produção de P(3HB) por duas espécies de bactérias (*C. necator* e *Paracoccus denitrificans*) e constataram que a presença de íons de sódio, provenientes da produção do biodiesel, foram identificados como tendo efeito negativo, tanto no crescimento celular, quanto no acúmulo do polímero.

Cavalheiro *et al.* (2012) estudaram os efeitos dos parâmetros produtivos na produção de poli(3-hidroxi-butirato-co-4-hidroxi-butirato) (P(3HB-co-4HB)) e poli(3-hidroxi-butirato-4-hidroxi-butirato-3-hidroxi-valerato) (P(3HB-4HB-3HV)) por *Cupriavidus necator*. Foi utilizado como fonte de carbono glicerol proveniente de uma planta de biodiesel (40 g L⁻¹). A incorporação do monômero 4HB foi promovida por γ -butirolactona (1,1 L⁻¹) e ácido propiônico (2 g L⁻¹) atuou como precursor do monômero 3HV. Os polímeros foram obtidos através do processo em batelada alimentada, em biorreator (2L) com volume útil de 1,8 L, em que a temperatura foi mantida em 34 °C e o pH foi controlado em 6,8. O melhor resultado para o P(3HB-co-4HB) apresentou produtividade de 0,17 g L⁻¹ h⁻¹ (após 64,3 h de cultivo), concentração total de 10,9 g L⁻¹, teor de polímero em 36,1 % e fração molar de 4HB de 17,6 %, com o nível de oxigênio dissolvido controlado em 20 % na fase de acúmulo do polímero. Já para o P(3HB-4HB-3HV), com o mesmo nível de oxigênio dissolvido, a produtividade final (após 67 horas de cultivo) foi de 0,25 g L⁻¹ h⁻¹, concentração total de biomassa de 45 de g L⁻¹, concentração do polímero de 16,7 g L⁻¹, teor de PHA de 36,9 %, fração molar de 4HB de 43,6 % e fração molar de 3HV de 6,0 %.

Posada *et al.* (2011) avaliaram o processo de produção de P(3HB), através de processo de simulação, utilizando glicerol purificado (88 % e 98 %, em massa). O micro-organismo utilizado no processo de simulação foi *Cupriavidus necator JMP 134* e os processos de produção de P(3HB) foram simulados utilizando Aspen Plus (Aspen Technologies Inc., EUA). O processo foi simulado com base em uma abordagem onde o glicerol é completamente consumido em duas fases. A primeira fase de fermentação é governada por um crescimento celular de massa e a segunda fase de fermentação é governada pelo acúmulo de P(3HB). A fermentação foi conduzida em pH 7, temperatura de 35 °C, com um tempo total de operação de 43,5 h (a fase de crescimento celular teve duração de 21 h e a síntese de P(3HB) ocorreu em 22,5 h). Obteve-se 50,4 g L⁻¹ de concentração total de biomassa e 4,5 g L⁻¹ de P(3HB) na fase de crescimento quando o processo foi conduzido com glicerol 88 %, e a fase de acúmulo de PHB atingiu concentração total de biomassa de 73,4 g L⁻¹ e concentração de PHB de 27,8 g L⁻¹. Para o processo a partir de glicerol 98 % a concentração total de biomassa e de P(3HB) na fase de crescimento foram 44,4 g L⁻¹ e 7,3 g L⁻¹, respectivamente; obteve-se ainda 91,5 g L⁻¹ de biomassa total e 57,1 g L⁻¹ de PHB ao final da fase de acúmulo de PHB.

Cavalheiro *et al.* (2009) avaliaram a utilização de glicerol puro (PG) e glicerol residual (GRP) como únicas fontes de carbono para a produção de P(3HB) a partir do micro-organismo *Cupriavidus necator*. Os experimentos foram conduzidos pelo processo de batelada alimentada em biorreator de 2 L, a temperatura foi mantida em 34 °C e o pH foi controlado em 6,8. A concentração de OD foi controlada em modo de cascata com a velocidade de agitação, mantendo constante a taxa de aeração. Durante as primeiras 10 h o OD foi controlado acima de 20 % de saturação, com uma taxa de aeração de 3 L_{ar} min⁻¹ e, posteriormente, em 15 % até que a velocidade de agitação atingiu 1600 rpm. A taxa de aeração foi subseqüentemente mantida a 2 vvm (volume de ar por volume de meio, por minuto) usando uma corrente de gás diferente (2 L_{ar} min⁻¹ suplementado com 1 L_{O₂} min⁻¹) até que a limitação de nitrogênio fosse imposta, ou até que a velocidade de agitação atingisse o limite superior novamente, forçando a redução do ponto de ajuste de oxigênio dissolvido. *C. necator* foi cultivada com diferentes concentrações de PG ou GRP para testar se o aumento das concentrações afeta a taxa de crescimento de culturas de baixa densidade. Os resultados indicaram que as concentrações iniciais de PG dentro da faixa estudada não afetam de forma significativa a taxa de crescimento. Por outro lado, os resultados sobre GRP indicam que a taxa de crescimento específico é máxima (cerca de 0,30 h⁻¹) no intervalo de 20-40 g L⁻¹. Acima deste intervalo, uma diminuição na taxa de crescimento é observada, o que pode ser causado pelo acúmulo de sódio no meio de cultura (considerando que o GRP contém 3 % (w/w) de Na⁺). Utilizando glicerol puro, a concentração celular chegou a 82,5 g L⁻¹, com acúmulo de 62 % de polímero, o que levou a uma produtividade volumétrica total de 1,52 g L⁻¹ h⁻¹. A concentração máxima de células, para o glicerol bruto, foi de 68,8 g L⁻¹, com acúmulo de 38 % e produtividade volumétrica de 0,84 g L⁻¹ h⁻¹.

4 METODOLOGIA

4.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado neste trabalho para a produção de P(3HB) foi a bactéria *Cupriavidus necator* – DSM 545, mutante da linhagem DSM 529 H1 para consumo de glicose (anteriormente denominada *Ralstonia eutropha*), conforme definição proposta pela *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (www.dsmz.de). As células foram armazenadas a -80 °C em microtubos de 2 mL, contendo 500 µL de meio de cultura em fase líquida e 500 µL de uma solução de glicerol comercial a 40 %.

4.2 Meio de cultivo

A ativação das células foi realizada em caldo nutriente (NB) constituído de 5,0 g L⁻¹ de peptona de carne e 3,0 g L⁻¹ de extrato de carne. O meio de cultivo utilizado foi formulado por Aragão (1996), e sua composição está demonstrada nas Tabelas 3 e 4.

Cada uma das substâncias da Tabela 3 foi pesada separadamente, preparando-se frascos contendo soluções-estoque (coluna A). Em seguida, cada constituinte das soluções 1 e 2 foi autoclavado separadamente, a 121 °C por 20 min, sendo depois acondicionado em refrigerador a 4 °C. Para a preparação do meio de cultivo (meio mineral – MM), utilizaram-se os volumes de solução estoque descritos na coluna B, formaram-se então três soluções que novamente foram autoclavadas durante 20 min a 121 °C. O pH da solução 1 foi ajustado a 7,0 com uma solução de NaOH 7,5 M ou HCl 11 M. Após resfriamento, as três soluções foram misturadas assepticamente para inoculação do micro-organismo.

Tabela 3. Composição do meio mineral (MM).

		A	B	C
	Componente	Concentração da solução estoque (g L ⁻¹)	Volume utilizado no meio de cultivo ^a (mL)	Concentração inicial do meio de cultivo (g L ⁻¹)
SOLUÇÃO 1	Ácido nitriloacético (NTA)	19,1	10	0,191
	Citrato férrico de amônia	10	6	0,06
	MgSO ₄ . 7H ₂ O	50	10	0,5
	CaCl ₂ . 2H ₂ O	5	2	0,01
	(NH ₄) ₂ SO ₄ ^b			5,0
	Solução de oligoelementos ^c		1	
	Água destilada ^d			
SOLUÇÃO 2	Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O	223,8	40	8,95
	KH ₂ PO ₄	37,5	40	1,5
SOLUÇÃO 3	Fonte de carbono ^e			30

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

^b Para essa substância não é preparada uma solução-estoque.

^c A composição da solução de oligoelementos é demonstrada na Tabela 4

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

^e Solução aquosa contendo 30 g L⁻¹ de açúcar invertido (glicose+frutose) adicionada diretamente ao meio, após ser esterilizada separadamente.

Tabela 4. Composição da solução de oligoelementos.

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

4.3 Condições de cultivo

Para o cultivo as células foram ativadas em frascos Erlenmeyer aletados (500 mL) contendo 100 mL de meio NB, sendo a condução do processo realizada em *shaker* com movimento rotatório 150 min^{-1} , a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 12 h (pré-inóculo). Após esse período, o pré-inóculo foi transferido para frascos Erlenmeyer aletados (1000 mL) contendo 300 mL do meio MM, em condição sem limitação de nitrogênio ($5,0 \text{ g L}^{-1}$), a uma fração de 10 % (v/v), sendo novamente incubadas em *shaker* com movimento rotatório 150 min^{-1} , a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h.

4.3.1 Ensaio em biorreator

Foram realizados três diferentes experimentos nas seguintes condições: cultivo sem adição de glicerol (ensaio SG); cultivo com adição de 20 g L^{-1} de glicerol puro na fase de produção do polímero (ensaio AG-FP) e cultivo com adição de 20 g L^{-1} de glicerol puro na fase de crescimento celular (ensaio AG-IC), sendo que cada experimento foi feito em duplicata. Todos os ensaios foram conduzidos com a mesma concentração de meio mineral e substrato (30 g L^{-1} de açúcar invertido). Os ensaios foram conduzidos em biorreator Biostat B (B. Braun), equipado com recipiente de cultura de 2 L (volume útil igual a 1,5 L), motor de agitação, chicana e rotor de 3 discos de turbina contendo 6 pás impulsoras, conforme na Figura 8. O biorreator foi autoclavado por 20 min a $121 \text{ }^\circ\text{C}$, contendo a solução 1 (Tabela 3) exceto para a substância de sulfato de amônio, cuja concentração foi de $2,3 \text{ g L}^{-1}$ (condição de limitação de nitrogênio). Após a esterilização foram adicionadas as soluções 2 e 3, previamente esterilizadas. O inóculo foi adicionado a uma fração de 10 % (v/v) do volume final do biorreator em condição com limitação de nitrogênio ($2,3 \text{ g L}^{-1}$), por um período de 72 h em processo de batelada alimentada. O processo foi conduzido com volume inicial de 1,5 L, temperatura foi mantida em $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e o pH foi controlado entre 6-7.

As condições de agitação e aeração variaram de 400 a 750 min^{-1} e $0,12$ vvm a 1 vvm, respectivamente, de forma que a pressão parcial de oxigênio dissolvido ($p\text{O}_2$) não ficasse abaixo de 20 %.

Alíquotas de 12 mL foram retiradas em intervalos, que variaram de 3 a 12 h, para determinação das concentrações de biomassa, P(3HB), nitrogênio e consumo de substrato.



Figura 8. Equipamentos para cultivo em biorreator: a) vaso de cultivo de 2 L; b) motor de agitação; c) chicana e d) turbinas de Rushton.

4.3.1.1 Alimentação em substrato

Sempre que a concentração de substrato se aproximou de 10 g L^{-1} foi realizada a adição de uma solução concentrada de açúcar invertido, de forma a permitir que a concentração de substrato retornasse a um valor entre 30 e 40 g L^{-1} . O consumo de substrato foi monitorado pelo método de DNS (item 4.6.1).

4.3.1.2 Alimentação em nitrogênio

O final da fase de crescimento celular e, portanto, início da fase de produção do polímero, foi definido no momento em que houve exaustão de nitrogênio, monitorado pelo método de Berthlot (item 4.7). Em cada ensaio realizado uma solução contendo fonte de nitrogênio e de fosfatos foi adicionada duas vezes ao biorreator, sempre que a concentração de nitrogênio se aproximava da exaustão com o objetivo de aumentar a concentração celular na fase de crescimento. A solução alimentada tinha a seguinte concentração: 3,45 g de sulfato de amônio; 5,4 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ e 6 g de KH_2PO_4 , em 20 mL de água.

4.3.1.3 Alimentação em meio mineral

Para garantir que não houvesse exaustão de nutrientes foi adicionado um pulso de 42,5 mL de uma solução de meio mineral (tabela 3), nas mesmas concentrações do início do cultivo, exceto para a fonte de carbono. No ensaio realizado com adição de glicerol na fase de produção do polímero a alimentação foi feita juntamente com o glicerol. Nas condições sem glicerol e com adição de glicerol no início do cultivo a alimentação ocorreu quando foi realizada a alimentação em substrato pela segunda vez.

4.4 Biomassa

A biomassa foi acompanhada por gravimetria, com o uso de microtubos de centrifugação (Eppendorf). Os tubos foram previamente secos em estufa da marca WTC Binder a 60 °C por 24 h e pesados em balança analítica da marca Mettler AT250. Alíquotas de 2 mL da amostra foram colocadas nesses tubos e centrifugadas a 6.610 g por 10 min. Em seguida, o meio foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com água destilada. A água foi retirada após nova centrifugação e as células secas em estufa a 60 °C até massa constante. Essa massa foi então convertida em concentração celular expressa em g L⁻¹.

4.5 Determinação da concentração de P(3HB)

Um volume de 2 mL de meio foi centrifugado e as células foram lavadas duas vezes com água destilada, sendo congeladas e posteriormente submetidas a metanólise, conforme o método baseado em Braunegg *et al.* (1978), com as modificações propostas por Brandl *et al.* (1988). Em seguida, o P(3HB) foi dosado por cromatografia gasosa.

Para elaboração da curva de correlação, o polímero puro (Aldrich) foi pesado de forma a se obter massas entre 0,001 e 0,04 g. Os padrões também foram submetidos à metanólise, bem como as amostras.

4.5.1 Metanólise

As células foram transferidas para tubos de ensaio, aos quais acrescentou-se 2 mL de metanol acidificado e 2 mL de clorofórmio. Para compor o metanol acidificado adicionou-se 15 % de ácido sulfúrico e ácido benzóico na concentração de $0,4 \text{ g L}^{-1}$, este utilizado como padrão interno.

Os tubos de ensaio foram vedados com fita veda-rosca, e em seguida levados ao banho termostático, com tampa, a $100 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 1 hora. Decorrido este tempo, os tubos de ensaio foram retirados e agitados em vórtex, voltando ao banho por mais 1 h 20 min. Finalmente, os tubos foram retirados do banho quente e levados a um banho de gelo para interromper a reação. Após resfriamento das amostras acrescentou-se 1 mL de água milli-Q, agitando-se novamente no vórtex durante 30 segundos para a formação de duas fases. Com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*, retirou-se a fase inferior (clorofórmio + polímero) passando-a a *vials* previamente identificados para a análise por cromatografia gasosa (CG).

4.5.2 Cromatografia gasosa

Após a metanólise, a concentração de polímero contida nas células foi analisada por cromatografia gasosa. Para tanto, utilizou-se um cromatógrafo CG-System 6890 da Agilent, equipado com detector de ionização de chama (FID – hidrogênio e oxigênio). O gás de arraste utilizado foi hélio a $3,5 \text{ mL min}^{-1}$ a fluxo constante e a temperatura de injeção e detecção foi de $250 \text{ }^\circ\text{C}$ e para a coluna utilizou-se rampa de temperatura de 80 a $200 \text{ }^\circ\text{C}$ ($20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$). Utilizou-se uma coluna de sílica fundida ($\varnothing 0,53 \text{ mm}/30\text{m}$) modelo Supercowax 10.

4.6 Determinação da concentração de substrato

4.6.1 Açúcares redutores

A determinação do consumo de substrato (glicose e frutose) foi realizada com base no método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), que determina a concentração de açúcares redutores. As amostras coletadas foram adequadamente diluídas para que estivessem dentro da curva padrão de glicose (apresentada no

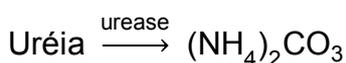
Anexo A), cujas concentrações variaram de 0 a 2 g L⁻¹. Em tubos de ensaio foram adicionados 0,5 mL de cada amostra e 0,5 mL de reagente DNS, que posteriormente foram submetidos a um tratamento térmico em banho de água a 100 °C por 5 min. Em seguida, os tubos foram resfriados em banho de gelo e acrescidos de 5 mL de água deionizada. A absorbância foi lida a 540 nm em espectrofotômetro LKB Biochron – Novaspec II.

4.6.2 Glicerol

O consumo de glicerol foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Merck Hitachi modelo D-7000IF) com detector de índice de refração modelo RI-71 Merck, com a coluna de marca Transgenomic, modelo IC Sep ICE-ION Column (trocadora de prótons). A fase móvel utilizada foi H₂SO₄ 8,5 mmol L⁻¹ tendo fluxo de eluente de 0,4 mL min⁻¹ e temperatura do forno de 70 °C com volume de injeção de 10 µL.

4.7 Nitrogênio

Para verificação do consumo de nitrogênio foi utilizado o *kit* Uréia ES, baseado no método enzimático-colorimétrico Berthlot, para determinar a uréia no soro, no plasma e na urina. Nesse método, a uréia é transformada em carbonato de amônia na presença de urease. O íon amônio, na presença de salicilato, hipoclorito e nitroprussiato (NP), forma azul de indofenol, conforme esquema a seguir, produto cuja intensidade da cor formada é diretamente proporcional à concentração de uréia na amostra.



Reativos do kit:

- Reativo 1: 100 mL de solução-tampão fosfato 0,1 M, salicilato 0,3 M, nitroprussiato de sódio 17 mM e EDTA 7 mM
- Reativo 2: 17 mL de hipoclorito de sódio 0,32 M em NaOH 4,0 M

- Reativo 3: 20 mL de solução de urease em tampão fosfato
- Reativo 4: solução padrão: 5mL de solução aquosa de uréia 70 mg dL⁻¹
- Reativo 1 A: mistura de 5 partes do reativo 1 com 0,2 parte de reativo 3

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

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

	Branco	Padrão	Amostra
Reativo 4	---	10 µL	---
Amostra	---	---	10 µL
Reativo 1A	1 mL	1 mL	1 mL
Misturar. Incubar exatamente 5 min a 37 °C. Adicionar:			
Reativo nº 2	1 mL	1 mL	1 mL
Misturar. Incubar exatamente 5 min a 37 °C.			

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

$$\text{NH}_4^+ \text{ (mg dL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Abs amostra}}{\text{Abs padrão}} \times 70 \quad (1)$$

Onde:

NH₄⁺: concentração de nitrogênio na forma de amônia determinada na reação;

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

Abs padrão: amostra: absorbância obtida na leitura do padrão em espectrofotômetro a 600 nm;

70: concentração da solução padrão em mg dL⁻¹

4.8 Metodologia utilizada para determinação dos parâmetros cinéticos

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

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

X_r (biomassa residual) = $X_t - P(3HB)$ intracelular

4.8.1 Fatores de conversão

O fator de conversão de substrato em célula $Y_{Xr/S}$ ($g\ g^{-1}$) e o fator de conversão de substrato em produto $Y_{P(3HB)/S}$ ($g\ g^{-1}$) foram determinados por meio das equações 2 e 3, respectivamente:

$$Y_{Xr/S} = \frac{[X_{r_t} - X_{r_o}]}{S_{consumido}} \quad (2)$$

$$Y_{P(3HB)/S} = \frac{[P(3HB)_t - P(3HB)_o]}{S_{consumido}} \quad (3)$$

Onde:

X_{r_t} , $P(3HB)_t$: valores de concentração celular ($g\ L^{-1}$) e concentração em P(3HB) ($g\ L^{-1}$), respectivamente, no tempo t ;

X_o e $P(3HB)_o$: valores iniciais (em relação à fase considerada) de concentração celular ($g\ L^{-1}$) e concentração de P(3HB) ($g\ L^{-1}$), respectivamente;

$S_{consumido}$: quantidade de substrato consumido no período considerado ($g\ L^{-1}$).

4.8.2 Produtividade em células

A produtividade em células (considerada apenas na fase de crescimento celular) P_{Xr} ($g\ L^{-1}\ h^{-1}$) foi determinada por meio da equação 4:

$$P_{Xr} = \frac{[Xr_t - Xr_o]}{(t_t - t_o)} \quad (4)$$

Onde:

Xr_t : valor de concentração celular ($g L^{-1}$) no tempo t .

X_o : valores inicial (em relação à fase considerada) de concentração celular ($g L^{-1}$).

t_t = tempo de fermentação (h) correspondente a Xr_t

t_o = tempo inicial (h) do período considerado

4.8.3 Produtividades em P(3HB)

A produtividade global em polímero $Pg_{P(3HB)}$ ($g L^{-1} h^{-1}$) e a produtividade em polímero apenas da fase de produção (considerada a partir da limitação em nitrogênio, e conseqüentemente, início da fase de produção do polímero) $P_{P(3HB)prod}$ ($g L^{-1} h^{-1}$) foram determinadas por meio das equações 5 e 6.

$$Pg_{P(3HB)} = \frac{[P(3HB)_k - P(3HB)_o]}{(t_k - t_o)} \quad (5)$$

$$P_{P(3HB)prod} = \frac{[P(3HB)_k - P(3HB)_o]}{(t_k - t_o)} \quad (6)$$

Onde:

$P(3HB)_k$: valores concentração em P(3HB) ($g L^{-1}$), no tempo k .

$P(3HB)_o$: valor inicial (em relação à fase considerada) de concentração de P(3HB) ($g L^{-1}$).

t_k = tempo de fermentação (h) correspondente a $P(3HB)_k$

t_o = tempo inicial (h) do período considerado

4.8.4 Velocidade específica máxima de crescimento celular

A velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) foi obtida graficamente por meio do coeficiente angular da reta obtida relacionando-se o logaritmo neperiano da massa celular (Xr) com o tempo, de acordo com a equação 7.

$$\ln(X_r) = \ln(X_o) + \mu_{\max} t \quad (7)$$

Onde:

X_r é a concentração celular;

X_o é a concentração celular inicial;

μ_{\max} é a velocidade específica máxima de crescimento;

t é o tempo de cultivo.

4.9 Extração de PHA

A extração do PHA foi realizada utilizando-se uma adaptação ao método proposto por Garcia (2006). Para a etapa de extração, o meio congelado após cada ensaio em biorreator foi descongelado e homogeneizado, sendo retiradas alíquotas de 45 mL, que foram transferidas para tubos de centrifugação (50 mL) e centrifugadas a 1.700g por 40 min. O sobrenadante foi descartado. As células foram lavadas com água destilada duas vezes. Na segunda etapa do processo de lavagem as células foram transferidas em alíquotas de 2 mL para tubos de microcentrifugação e centrifugadas a 5.220g por 15 min. Em seguida, adicionou-se 1 mL de clorofórmio P.A. e 1,25 g de pérolas de vidro com 0,75 mm de diâmetro. Os tubos de microcentrifugação foram fechados, vedados com auxílio de fita crepe e levados ao moinho (Retsch) por 20 min em rotação máxima. Os tubos de microcentrifugação foram novamente centrifugados a 5.220g por 15 min, resultando na formação de três camadas: a inferior composta pelas pérolas de vidro; a intermediária contendo clorofórmio e polímero dissolvido e a superior formada pelos rejeitos (*debris*) celulares. Com auxílio de uma espátula retirou-se a fase superior, posteriormente a fase intermediária foi vertida em placas de Petri, as quais foram deixadas para secagem à temperatura ambiente para a formação dos filmes poliméricos.

Um processo de purificação foi necessário, pois o filme formado contém muitas impurezas. A etapa consistiu em solubilizar os filmes de PHA em clorofórmio na razão de 3,3 % m/v, sob agitação constante em temperatura de aproximadamente 60 °C. Após, foi adicionado hexano na proporção 1:1 (v/v) sob agitação constante, ocorrendo a precipitação da solução. Os cristais poliméricos

formados foram filtrados a vácuo. O produto seco retido na membrana foi pesado e dissolvido novamente em clorofórmio na concentração de 10 g L^{-1} , vertido em placa de Petri e deixado evaporar para formação do filme em uma cuba de vidro onde o solvente foi eliminado em atmosfera saturada de clorofórmio para evitar a separação de fases que pode ocorrer por ação da umidade.

4.10 Caracterização

Os polímeros obtidos a partir dos cultivos de *Cupriavidus necator* foram caracterizados pelas técnicas de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), calorimetria diferencial exploratória (DSC).

4.10.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização dos grupamentos funcionais dos polímeros foi feita por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), em equipamento da Perkin Elmer Frontier. Foram realizadas 16 varreduras por amostra, de 650 a 4000 cm^{-1} , no modo de refletância total atenuada (ATR – attenuated total reflectance), com elemento de seleneto de zinco.

4.10.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H)

A obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foi realizada a temperatura ambiente, utilizando clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente. As amostras foram dissolvidas em clorofórmio após agitação. O Equipamento utilizado foi Bruker – 250 MHz .

4.10.3 Análise termogravimétrica (TGA)

As análises de TGA foram realizadas visando verificar a degradação térmica e a perda de massa (amostras degradadas) e determinar a estabilidade térmica dos polímeros obtidos. Serão determinadas a temperatura de degradação (T_{onset}) e a

temperatura máxima de degradação (T_{max}). As análises foram realizadas em equipamento da TA Instruments modelo TGA-Q50. As amostras foram aquecidas de 25 a 500 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, sob atmosfera de nitrogênio.

4.10.4 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

As análises de DSC foram realizadas utilizando-se o equipamento TA Instruments modelo DSC-Q20 para caracterizar o polímero quanto à temperatura de fusão (T_m) e temperatura de transição vítrea (T_g). As amostras foram seladas em painéis de alumínio sob atmosfera inerte (nitrogênio), aquecidas de 25 a 200 °C com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e mantidas nessa temperatura por 1 minuto. Em seguida, foram resfriadas rapidamente de 200 a -90 °C e mantidas nessa temperatura por 10 min. Um segundo aquecimento será realizado no intervalo de temperatura de -90 a 200 °C com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹. O grau de cristalinidade foi calculado por meio da equação 8.

$$\alpha_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \times 100\% \quad (8)$$

Onde:

ΔH_m = entalpia de fusão da amostra (J g⁻¹)

ΔH_m^0 = entalpia de fusão considerando polímero 100% cristalino (J g⁻¹)

Para P(3HB) $\Delta H_m^0 = 142$ (J g⁻¹) (VOGELSANGER, *et al.* 2003).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaios em biorreator

Na Tabela 6 estão relacionados os dados cinéticos dos ensaios em biorreator, sendo que para cada ensaio está apresentada a média e o desvio padrão.

Tabela 6. Parâmetros cinéticos dos cultivos realizados sem adição de glicerol, com adição de 20 g L⁻¹ de glicerol puro na fase de produção do polímero (AG-FP) e com adição de 20 g L⁻¹ de glicerol puro no início do cultivo (AG-IC).

Parâmetro cinético	Ensaio					
	SG		AG-FP		AG-IC	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Xt (g L ⁻¹)	39,19	4,02	35,60	2,19	38,33	2,44
Xr (g L ⁻¹)	17,65	1,64	14,31	0,65	12,48	1,13
P(3HB) (g L ⁻¹)	21,54	2,38	21,29	1,54	24,58	1,79
Acúmulo P(3HB) (%)	54,93	0,46	59,83	0,58	64,12	0,56
P(3HB) _{cresc} (g L ⁻¹)	10,22	2,46	8,04	0,87	8,64	0,27
Acúmulo P(3HB) _{cresc} (%)	47,33	3,59	46,6	0,19	44,88	4,98
Consumo total de substrato (g L ⁻¹)	98,29	6,65	96,15	4,85	92,06	1,64
Consumo total de glicerol (g L ⁻¹)	-	-	9,18	0,028	19,44	0,056
P _{Xr} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0,53	0,045	0,53	0,06	0,49	0,018
P _{gP(3HB)} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0,30	0,035	0,30	0,021	0,34	0,025
P _{P(3HB)prod} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0,23	0,008	0,25	0,019	0,32	0,012
Y _{P(3HB)/S} (g g ⁻¹)	0,22	0,010	0,20	0,005	0,22	0,013
Y _{Xr/S} (g g ⁻¹)	0,17	0,002	0,12	0,01	0,12	0,002
Y _{Xr/S cresc} (g g ⁻¹)	0,22	0,013	0,19	0,018	0,17	0,013
Y _{P(3HB)/S prod} (g g ⁻¹)	0,23	0,0009	0,22	0,002	0,26	0,029
μ _{max} (h ⁻¹)	0,16	0,03	0,18	0,003	0,16	0,024

Nos cultivos de *C. necator* sem adição de glicerol e com adição de glicerol na fase de produção do polímero a fase exponencial de crescimento foi até 21 h, sendo que a limitação em nitrogênio ocorreu após 21 h de cultivo. Os valores de velocidade específica de crescimento (μ_{max}) foram de 0,16 h⁻¹ para o cultivo sem glicerol e 0,18 h⁻¹ para o cultivo AG-FP. Para o cultivo com adição de glicerol no início do cultivo a fase exponencial de crescimento foi até 20 h, a limitação em nitrogênio ocorreu

também após 20 h de cultivo e a velocidade específica de crescimento foi de $0,16 \text{ h}^{-1}$. Os resultados para os valores de μ_{max} obtidos neste trabalho estão um pouco abaixo da faixa de crescimento para o *Cupriavidus necator*. Dalcanton (2006) estimou, com base no modelo matemático de Gompertz Modificado, a velocidade específica máxima de crescimento de *Ralstonia eutropha* (atualmente *C. necator*), tendo como fonte de carbono glicose nas temperaturas de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $32,5 \text{ }^\circ\text{C}$, $35 \text{ }^\circ\text{C}$, $37,5 \text{ }^\circ\text{C}$ e $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Os resultados para velocidade específica máxima de crescimento foram $0,21 \text{ h}^{-1}$, $0,24 \text{ h}^{-1}$, $0,24 \text{ h}^{-1}$, $0,23 \text{ h}^{-1}$, $0,35 \text{ h}^{-1}$ respectivamente; Schneider (2006) tendo como fonte de carbono glicose e frutose obteve $0,25 \text{ h}^{-1}$ para temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e $0,22 \text{ h}^{-1}$ para $37 \text{ }^\circ\text{C}$, e Marangoni *et al.* (2001) avaliando o crescimento celular de *Ralstonia eutropha* (atualmente *C. necator*) na presença de 20 g L^{-1} de açúcar invertido obtiveram velocidade específica máxima de crescimento igual a $0,26 \text{ h}^{-1}$, em temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$; esses mesmos autores utilizando 20 g L^{-1} de lactose hidrolisada como fonte de carbono, nas temperaturas de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e $34 \text{ }^\circ\text{C}$, obtiveram velocidade específica máxima de crescimento de $0,22 \text{ h}^{-1}$ e $0,25 \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

Nas Figuras 9, 10 e 11 estão ilustradas as curvas cinéticas dos cultivos realizados em meio sem adição de glicerol (SG), com adição de 20 g L^{-1} de glicerol na fase de produção do polímero (AG-FP) e com adição de 20 g L^{-1} de glicerol no início do cultivo (AG-IC), respectivamente. Os pontos representados nos gráficos correspondem aos valores experimentais de biomassa total (X_t), biomassa residual (X_r) e concentração de P(3HB), e as curvas apresentadas foram obtidas por ajuste polinomial dos dados experimentais.

É possível observar, analisando os resultados das curvas de biomassa residual ($X_r = X_t - P(3HB)$) de todos os cultivos, que o aumento da biomassa celular ocorreu até a limitação em nitrogênio (representada pela linha tracejada vertical – Figuras 9, 10 e 11). No Anexo B estão apresentadas as curvas de concentração de nitrogênio *versus* tempo dos cultivos realizados. Após a limitação em nitrogênio as células praticamente pararam de crescer e passaram a acumular P(3HB) de forma intracelular, comportamento característico de *Cupriavidus necator* que já foi observado por diversos autores como Apati (2012), Cavalheiro *et al.* (2009) e Garcia (2006).

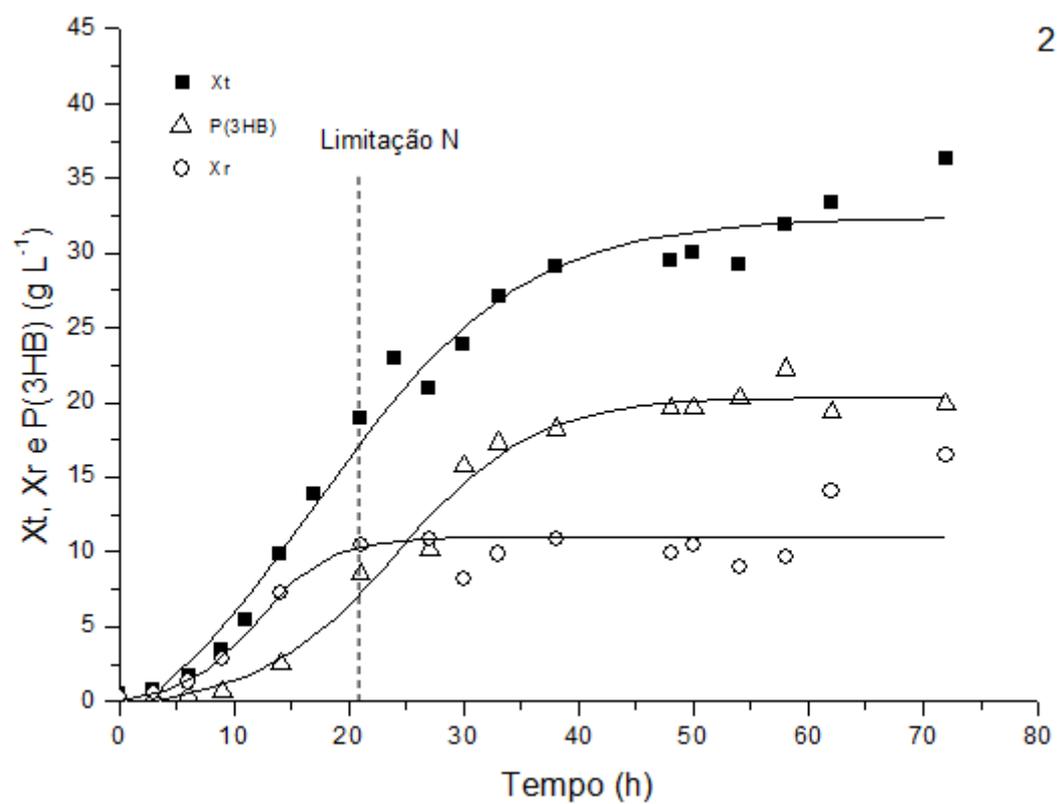
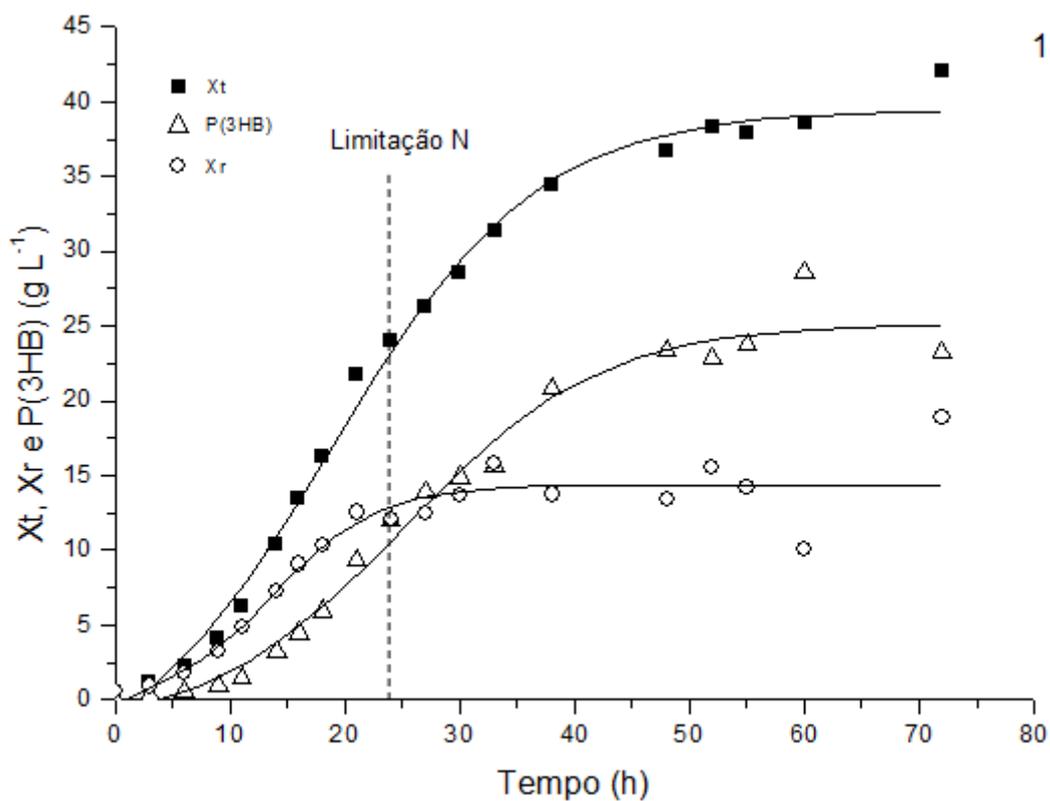


Figura 9. Cinética de crescimento de *Cupriavidus necator* e produção de P(3HB) em cultivo realizado sem adição de glicerol.

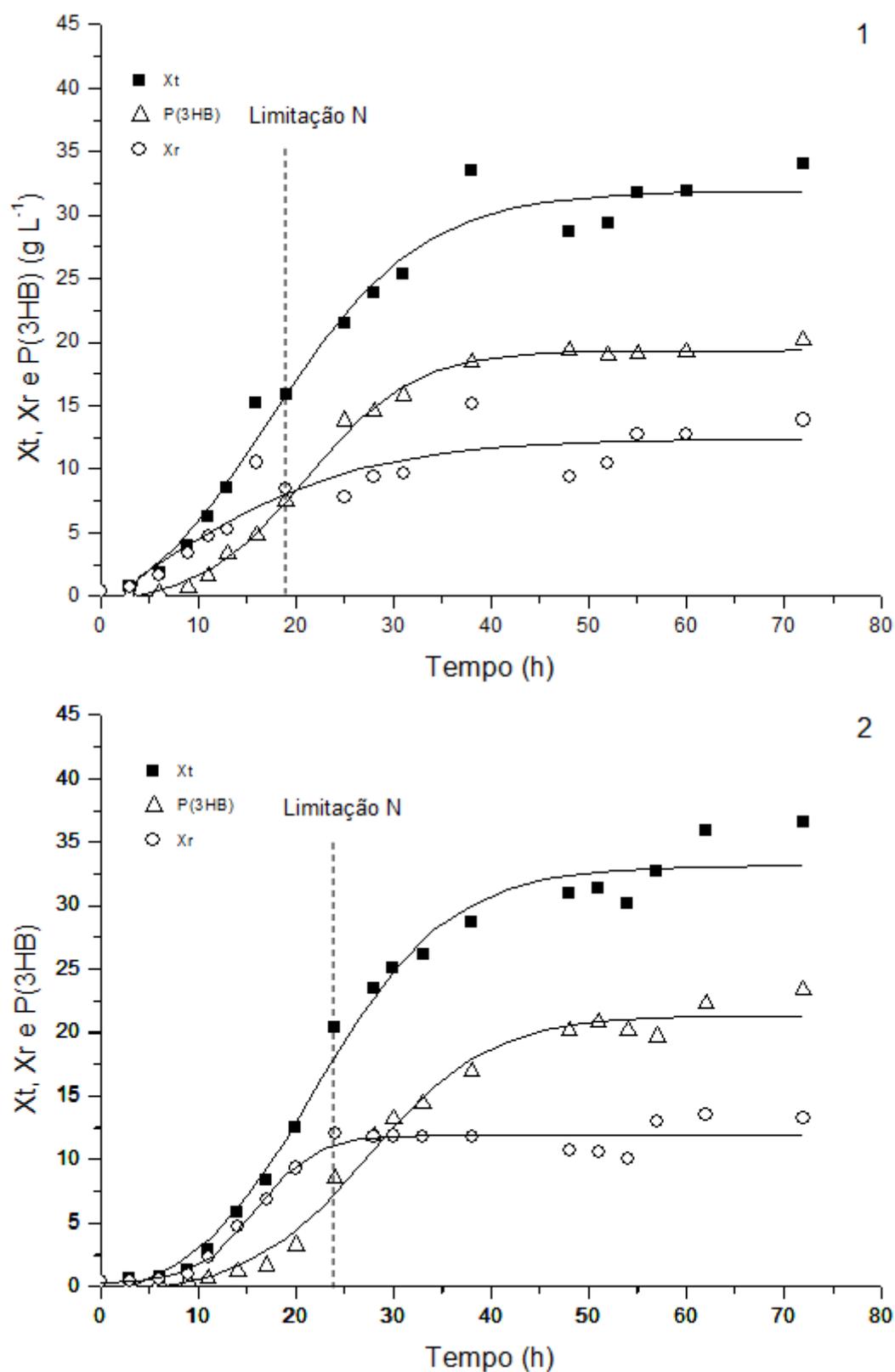


Figura 10. Cinética de crescimento de *Cupriavidus necator* e produção de P(3HB) em cultivo realizado com adição de 20 g L^{-1} de glicerol na fase de produção do polímero.

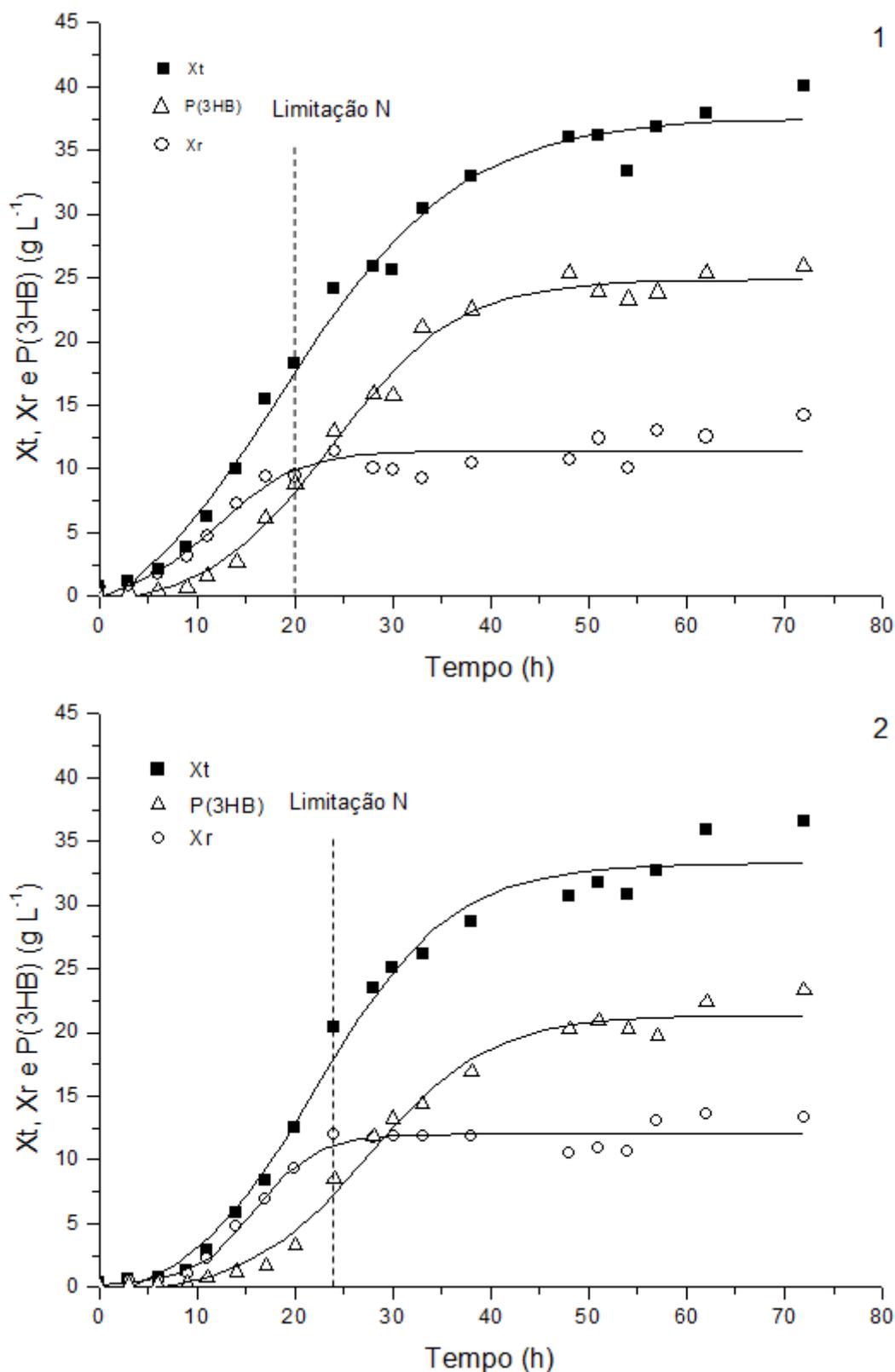


Figura 11. Cinética de crescimento de *Cupriavidus necator* e produção de P(3HB) em cultivo realizado com adição de 20 g L⁻¹ de glicerol no início do cultivo.

É possível observar ainda acúmulo de P(3HB) durante a fase de crescimento celular em todos os cultivos realizados; 10,22 g L⁻¹ para o cultivo SG; 8,04 g L⁻¹ para os ensaios AG-FP e 8,64 g L⁻¹ para os cultivos AG-IC. Cavalheiro *et al.* (2009) também observaram o acúmulo de P(3HB) antes da exaustão em nitrogênio em cultivos em batelada alimentada utilizando glicerol puro (7,4 g L⁻¹) e glicerol bruto (4,3 g L⁻¹) como fonte de carbono. Segundo Aragão (1996), a produção de P(3HB) durante essa fase, em condições balanceadas do meio de cultivo, é de 15 % a 20 % da biomassa total. Neste trabalho, foi possível observar acúmulo de P(3HB) entre 45 % a 50 % (Tabela 6) na fase de crescimento celular em todos os experimentos realizados, provavelmente devido à estratégia de alimentação utilizada para aumentar a biomassa durante esse período, que foi realizada quando a concentração de nitrogênio se aproximava da exaustão. De acordo com Schneider (2006), que também observou acúmulo de P(3HB) pouco antes da exaustão do nitrogênio, baixas concentrações de nitrogênio já podem permitir o acúmulo intracelular do polímero.

O consumo de substrato de todos os experimentos ocorreu durante todo o tempo de cultivo, com perfis de consumo muito parecidos (Anexo C – Figuras 25, 26 e 27). A produção de P(3HB) no interior da célula foi muito similar, atingindo concentrações de 21,54 g L⁻¹ para o cultivo SG; 21,29 g L⁻¹ para o cultivo AG-FP e 24,58 g L⁻¹ e para o cultivo AG-IC; valores superiores aos obtidos por Apati (2012) cultivando *C. necator* em processo de batelada conduzido por 24 h (9,1 g L⁻¹ para cultivo com adição de 15 g L⁻¹ de glicerol puro na fase de crescimento celular e 9,4 g L⁻¹ para cultivo sem adição de glicerol). A adição de glicerol não favoreceu o acúmulo total de P(3HB) e de biomassa, uma vez que os valores obtidos foram muito semelhantes em todos os cultivos. No entanto, a adição de glicerol no início do cultivo levou a maiores valores de percentual de acúmulo de P(3HB) e de produtividade em P(3HB) na fase de produção, em relação aos ensaios sem adição de glicerol ou quando o glicerol foi adicionado somente na fase de produção do polímero; para os cultivos AG-IC os valores foram de 64,12 % de acúmulo de P(3HB) e produtividade de 0,32 g L⁻¹ h⁻¹; acúmulo de 59,83 % para os cultivos AG-FP e $P_{P(3HB)_{prod}} = 0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, e os cultivos SG tiveram acúmulo 54,93 %, com produtividade de 0,23 g L⁻¹ h⁻¹. Na Figura 12 estão apresentados os valores de produtividade em P(3HB) na fase de produção, que foram um pouco mais elevados para o cultivo AG-IC. Para a produtividade global os resultados foram semelhantes

para as três condições testadas ($0,30 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para os cultivos SG e AG-FP e $0,34 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para o cultivo com adição de glicerol no início do cultivo).

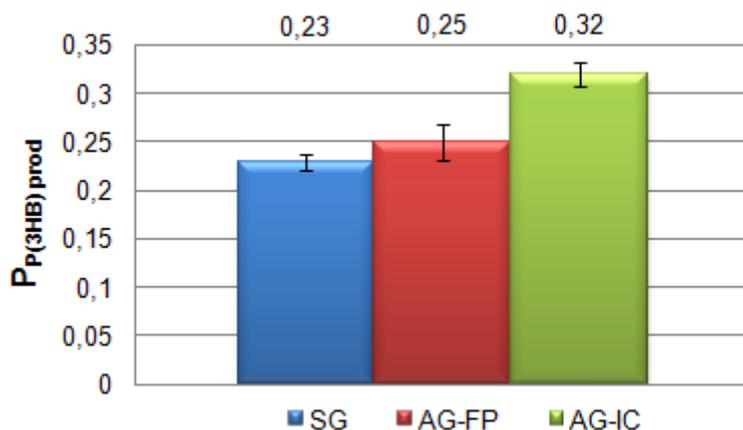


Figura 12. Gráfico de colunas com valores de produtividade na fase de produção do polímero ($P_{P(3HB)prod}$).

Cavalheiro *et al.* (2009) cultivando *C. necator* em batelada alimentada, chegaram a uma produtividade $1,52 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ utilizando glicerol puro (a concentração celular chegou a $82,5 \text{ g L}^{-1}$, com acúmulo de 62 % de polímero) e de $0,84 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a partir de glicerol bruto (a concentração máxima de células foi de $68,8 \text{ g L}^{-1}$, com acúmulo de 38 %). Mothes *et al.* (2007) também reportaram uma redução do conteúdo de P(3HB) de 70 % (obtido a partir de glicerol puro) para 48 % quando glicerol bruto (com pureza de 80 % contendo 5,5 % de NaCl) foi utilizado em cultivos a partir de *C. necator* JMP 134. Kachrimanidou *et al.* (2014) cultivaram *C. necator* DSM 7237 utilizando glicerol bruto (92,4 % m/m de pureza) como fonte de carbono e hidrolisado de farinha de girassol como fonte de nitrogênio e obtiveram concentração de P(3HB) de $24,6 \text{ g L}^{-1}$ (com biomassa total de $32,2 \text{ g L}^{-1}$), conteúdo de P(3HB) de 76,4 %, produtividade de $0,31 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e fator de conversão de 0,30 g de P(3HB) por g de glicerol consumido. O glicerol puro tem um custo mais elevado do que o glicerol bruto, mas o rendimento de P(3HB) é mais elevado quando o glicerol puro é usado como matéria-prima. De acordo com Posada *et al.* (2011) os custos de purificação de glicerol bruto a 88 % e 98 % são de 0,098 US\$/L e 0,1124 US\$/L, respectivamente. Os autores ainda citam que o processo de purificação de glicerol representa apenas entre 4,8 e 5,6 % do custo total da produção de PHB quando glicerol a 88 % é empregado e este valor aumenta para 6,3-7,7 % quando glicerol a 98 % é utilizado. No entanto, obtêm-se os custos de produção mais baixos, quando

glicerol a 98 % é utilizado no processo de fermentação, devido ao maior rendimento de PHB na fase de fermentação. Os custos totais de produção de PHB são obtidos entre 2.11 e 2.44 US\$/kg, quando glicerol a 88 % é utilizado no processo de fermentação, e entre 1.94 e 2.38 US\$/kg, quando glicerol a 98 % é utilizado.

A produtividade máxima em P(3HB), que para todos os ensaios ocorreu entre 30 e 33h, apresentou valores de $0,51 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para as três estratégias de cultivo (com desvio padrão de $\pm 0,006$ para SG, $\pm 0,008$ para AG-FP e $\pm 0,09$ para AG-IC). Na Figura 13 estão apresentados gráficos em que é possível observar a evolução da produtividade em P(3HB) em função do tempo de cultivo celular.

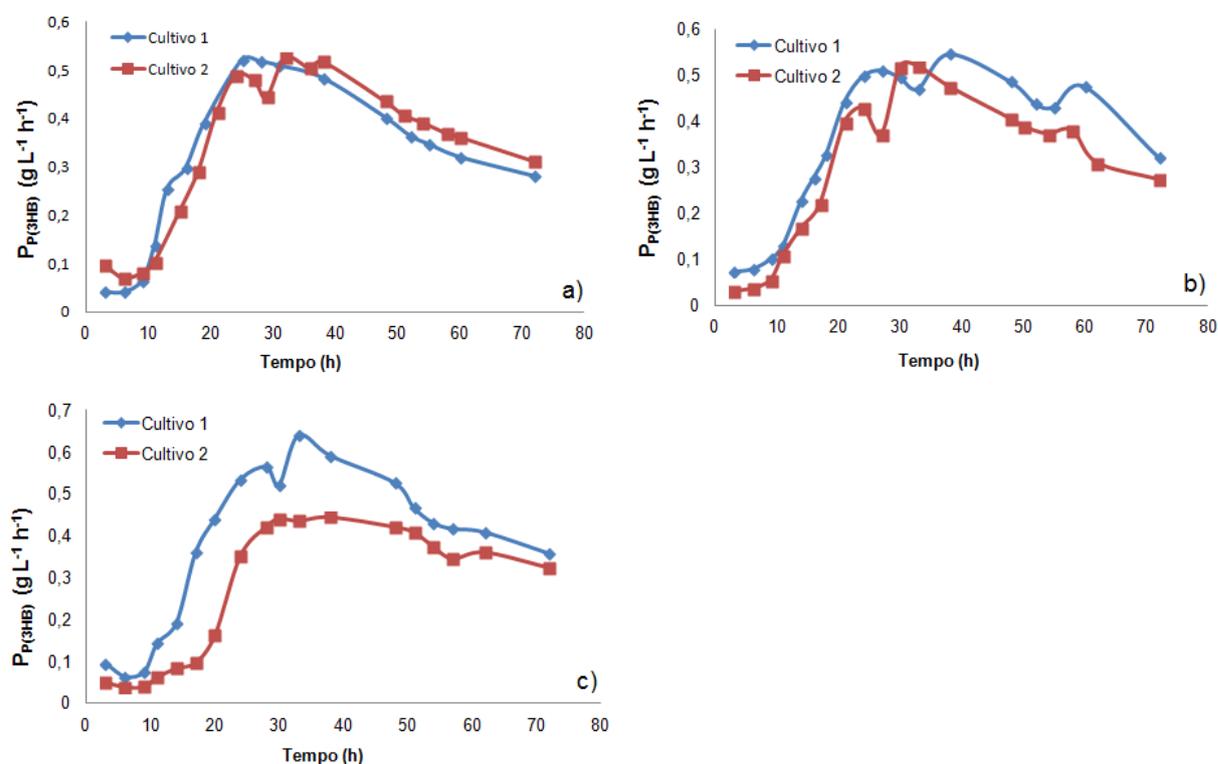


Figura 13. Produtividade em P(3HB) em função do tempo de cultivo: a) cultivo SG, b) cultivo AG-FP e c) AG-IC.

O fato da adição do glicerol no início do cultivo ter favorecido o aumento do percentual de acúmulo de P(3HB) e de produtividade em P(3HB) na fase de produção em relação aos cultivos com adição de glicerol na fase de produção pode ser explicado em decorrência do micro-organismo já estar adaptado ao glicerol, pois nos experimentos AG-IC a velocidade de consumo de glicerol foi de $0,22 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, enquanto que para os cultivos AG-FP essa velocidade foi de $0,18 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Para os

cultivos com adição de glicerol no início do cultivo, a velocidade de consumo do glicerol durante a fase de crescimento celular foi maior do que na fase de produção do polímero. No início do cultivo a velocidade de consumo de glicerol foi de $0,38 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (com consumo total de glicerol de $7,77 \text{ g L}^{-1}$ em 20 horas de cultivo), enquanto que na fase de produção a velocidade de consumo de glicerol foi $0,22 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (com consumo total de $11,67 \text{ g L}^{-1}$ durante 52 h). Cavalheiro *et al.* (2009) sugerem que antes do esgotamento de nitrogênio o glicerol esteja sendo direcionado principalmente para a produção e manutenção de células e após exaustão de nitrogênio o glicerol é utilizado principalmente para a produção de P(3HB).

Na Figura 14 estão apresentados os valores de fator de conversão global de substrato em biomassa residual. Nos ensaios com adição de glicerol foi possível observar os menores valores de fator de conversão de substrato em biomassa residual ($Y_{Xr/S}$), tanto para AG-FP quanto para AG-IC esses valores foram $0,12 \text{ g g}^{-1}$, enquanto que nos ensaios sem adição de glicerol foi possível observar valores de $Y_{Xr/S}$ de $0,17 \text{ g g}^{-1}$, o que indica que a utilização apenas de açúcar invertido como fonte de carbono favorece o crescimento celular, fato que ficou evidenciado também pelo maior valor de P_{Xr} nos experimentos em que não houve adição de glicerol na fase de crescimento celular, $0,53 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para os ensaios SG e AG-FP, quando comparados ao experimento AG-IC que apresentou valor igual a $0,49 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Cultivando *C. necator* a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e utilizando açúcar invertido como substrato Schneider (2006) obteve um fator de conversão de substrato em biomassa residual de $0,24 \text{ g g}^{-1}$. Os valores de fator de conversão de substrato em produto encontrados neste trabalho ficaram entre $0,20$ e $0,22 \text{ g g}^{-1}$, próximo ao valor obtido por Campos *et al.* (2014), que obtiveram $Y_{P/S}$ de $0,19 \text{ g g}^{-1}$, utilizando glicerol como fonte de carbono.

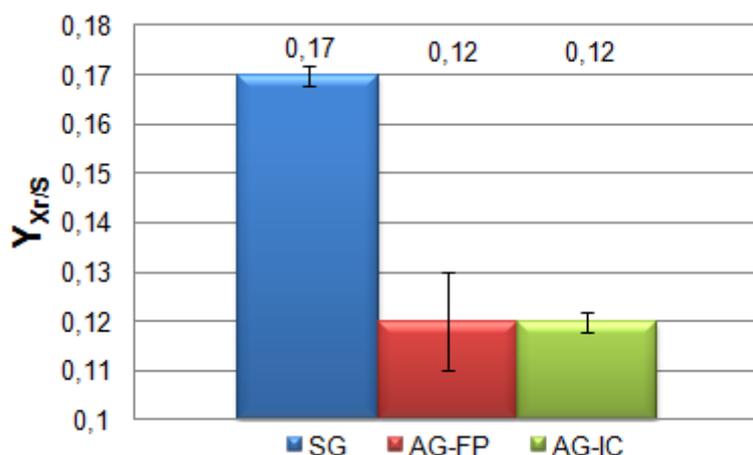


Figura 14. Gráfico de colunas com valores de fator de conversão global de substrato em biomassa residual.

Para avaliar a influência das diferentes estratégias de cultivo de *Cupriavidus necator* foi realizada uma análise estatística dos parâmetros cinéticos obtidos nesse estudo. A análise estatística foi avaliada pelo *software* Statistica 7 e a ferramenta utilizada foi o teste-t de Student (para duas amostras independentes). Nas tabelas 7, 8 e 9 estão apresentadas as análises do teste-t para fator de conversão de substrato em biomassa residual ($Y_{Xr/S}$), para o acúmulo percentual de P(3HB) para produtividade de P(3HB) na fase de produção do polímero, respectivamente. Para cada variável e suas interações estão demonstradas a média, o desvio padrão, o número de amostras (N), o grau de liberdade, o F calculado e a probabilidade dos valores serem significativos ($p < 0,05$). Para os demais parâmetros cinéticos (Tabela 6) não foi observada diferença estatisticamente significativa para nenhuma das variáveis testadas (as tabelas estão apresentadas no Anexo D).

Tabela 7. Teste t de Student para fator de conversão de substrato em biomassa residual ($Y_{Xr/S}$).

Variável	Média	Desvio padrão	N	Graus de liberdade	F	p (<0,05)
SG	0,1751	0,003				
AG-FP	0,1251	0,01	2	2	6,534	0,0226
SG	0,1751	0,003				
AG-IC	0,1185	0,002	2	2	22,211	0,0020
AG-FP	0,1251	0,01				
AG-IC	0,1185	0,002	2	2	0,882	0,4707

Tabela 8. Teste t de Student para acúmulo de P(3HB) (%).

Variável	Média	Desvio padrão	N	Graus de liberdade	F	p (<0,05)
AG-FP SG	59,83 54,953	0,5798 0,4596	2	2	9,356	0,011232
AG-IC SG	64,12 54,953	0,5657 0,4596	2	2	17,821	0,003134
AG-IC AG-FP	64,12 59,83	0,5657 0,5798	2	2	7,489	0,017365

Tabela 9. Teste t de Student para produtividade em polímero na fase de produção ($P_{P(3HB)prod}$).

Variável	Média	Desvio padrão	N	Graus de liberdade	F	p (<0,05)
SG AG-FP	0,23 0,25	0,008 0,019	2	2	-1,721	0,2273
SG AG-IC	0,23 0,32	0,008 0,012	2	2	-8,510	0,013
AG-FP AG-IC	0,25 0,32	0,019 0,012	2	2	-3,849	0,061

Para o $Y_{Xr/S}$, verificou-se, pela estimativa do p-valor fornecido pelo teste-t de Student, que os resultados são considerados estatisticamente significativos para o cultivo SG em relação ao cultivo AG-FP e também para o cultivo SG em relação ao cultivo AG-IC, enquanto que para os dois cultivos em que houve adição de glicerol não foi observada diferença significativa para o parâmetro $Y_{Xr/S}$. No entanto, para o acúmulo de P(3HB) (%), pode-se observar que os resultados obtidos pelas diferentes estratégias de cultivo (SG, AG-FP e AG-IC) são considerados estatisticamente significativos para as três variáveis, sendo que os melhores resultados foram obtidos quando se adicionou glicerol no início do cultivo celular. Para a $P_{P(3HB)prod}$ foi observada diferença estatística significativa apenas para o cultivo AG-IC em relação ao cultivo SG.

É importante ressaltar que os melhores resultados para $Y_{Xr/S}$ ocorreram na estratégia de cultivo sem adição de glicerol, indicando que a utilização apenas de açúcar invertido como substrato favorece o acúmulo de biomassa residual, enquanto que os melhores resultados para acúmulo (%), produtividade de P(3HB) na fase de produção do polímero e concentração total de P(3HB) (embora o último parâmetro

não tenha apresentado diferença estatística significativa) ocorreram com adição de glicerol no início do cultivo, evidenciando que o glicerol favorece a produção e o acúmulo de polímero.

5.2 Caracterização

5.2.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 15 apresenta os espectrogramas de FT-IR para os polímeros obtidos por *Cupriavidus necator* (SG, AG-FP e AG-IC). Observa-se que os espectros são muito semelhantes. Para todas as amostras foram detectados os picos característicos do P(3HB), que estão relacionados na Tabela 10.

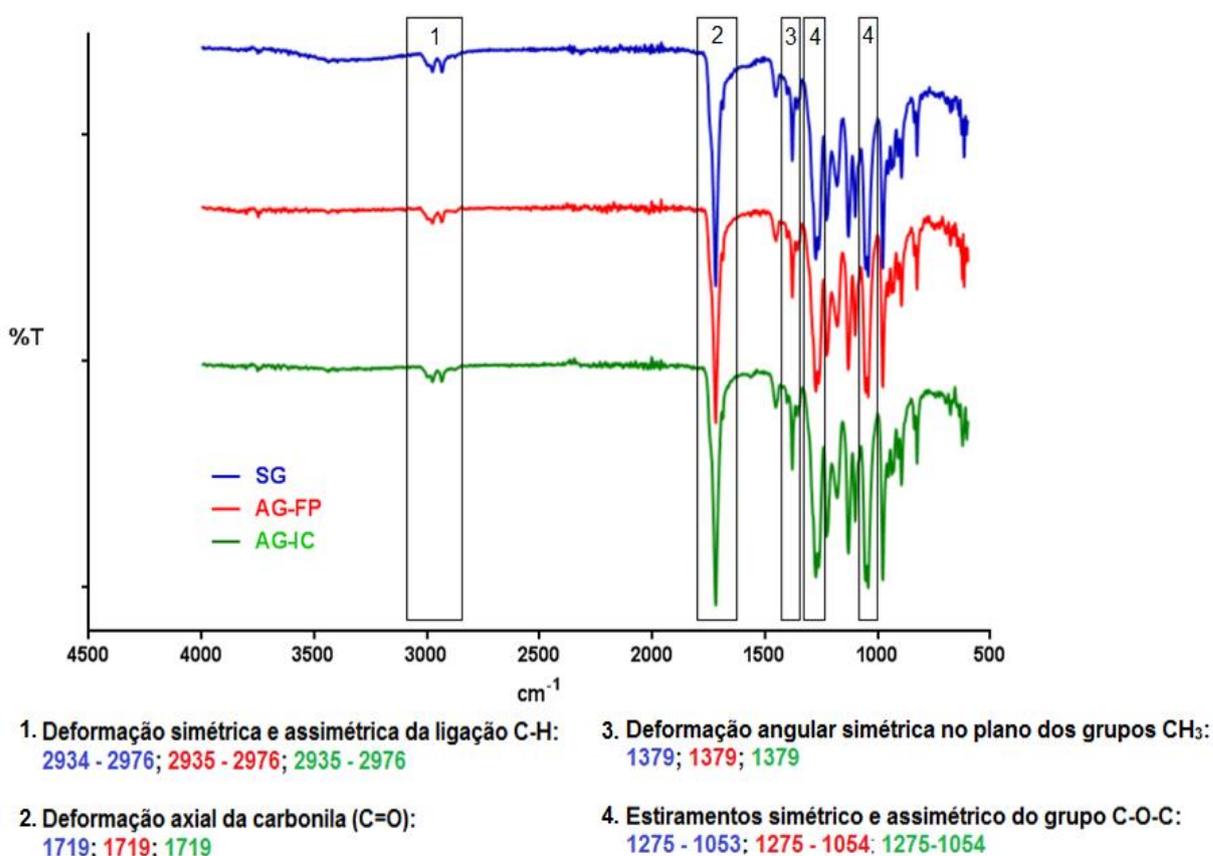


Figura 15. Espectrogramas de FTIR para os filmes de P(3HB).

Tabela 10. Relação de picos características no espectro de Infravermelho para os polímeros obtidos sem glicerol (SG), com adição de glicerol na fase de produção (AG-FP) e com adição de glicerol no início do cultivo (AG-IC) comparados com a literatura.

Atribuições	Comprimento de onda (cm ⁻¹)			Literatura
	Amostra SG	Amostra AG-FP	Amostra AG-IC	
Deformação simétrica e assimétrica da ligação C-H	2934 e 2976	2935 e 2976	2935 e 2976	2930 e 2988 ⁽¹⁾ 2933 e 2977 ⁽²⁾
Deformação axial da carbonila (C=O)	1719	1719	1719	1721 ⁽¹⁾ 1724 ⁽³⁾
Deformação angular simétrica no plano dos grupos CH ₃	1379	1379	1379	1382 ⁽¹⁾ 1379 ⁽²⁾ 1380 ⁽³⁾
Estiramentos simétrico e assimétrico do grupo C-O-C	1275 e 1053	1275 e 1054	1275 e 1054	1275 e 1051 ⁽¹⁾ 1275 e 1054 ⁽²⁾

⁽¹⁾GARCIA, 2006.

⁽²⁾APATI, 2012.

⁽³⁾XU *et al.*, 2002.

Para as três amostras os picos característicos do P(3HB) observados foram: deformações axiais simétrica e assimétrica da ligação C-H em 2976 e 2934-2935 cm⁻¹, deformações axiais da carbonila (C=O) em 1719 cm⁻¹, pico atribuído à vibração da carbonila do grupo éster no estado cristalino (XU *et al.*, 2002) e deformação angular simétrica no plano dos grupos CH₃ em 1379 cm⁻¹. Foram observados ainda picos em 1275 e 1053-1054 cm⁻¹, atribuídos aos estiramentos simétricos e assimétricos, respectivamente, do grupo C-O-C. Estes picos também foram observados por Apati (2012) e Garcia (2006).

5.2.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H)

Para confirmar a produção do P(3HB) foram realizadas análises de RMN ¹H com os polímeros sintetizados. Os deslocamentos dos picos de ressonância observados para os espectros de RMN ¹H do P(3HB), apresentados nas Figuras 16, 17 e 18, estão de acordo com aqueles publicados por DOI *et al.*, (1986) e são

atribuídos como se segue: o duplete a 1,28 é atribuído aos prótons do grupo metila do P(3HB), o multiplete em aproximadamente 5,27 é atribuído aos prótons do grupo metino do P(3HB), na região de 2,45-2,67 o multiplete está associado aos prótons do grupo metileno do P(3HB). A Tabela 11 apresenta os valores de deslocamento dos picos de ressonância reportados na literatura por Catoni (2011) e Simon-Colin (2008), assim como os picos obtidos neste trabalho para as três amostras sintetizadas. Considerando que o espectro apresenta apenas um tipo de grupo R (o grupo metila), conclui-se que o poliéster em questão é o homopolímero P(3HB).

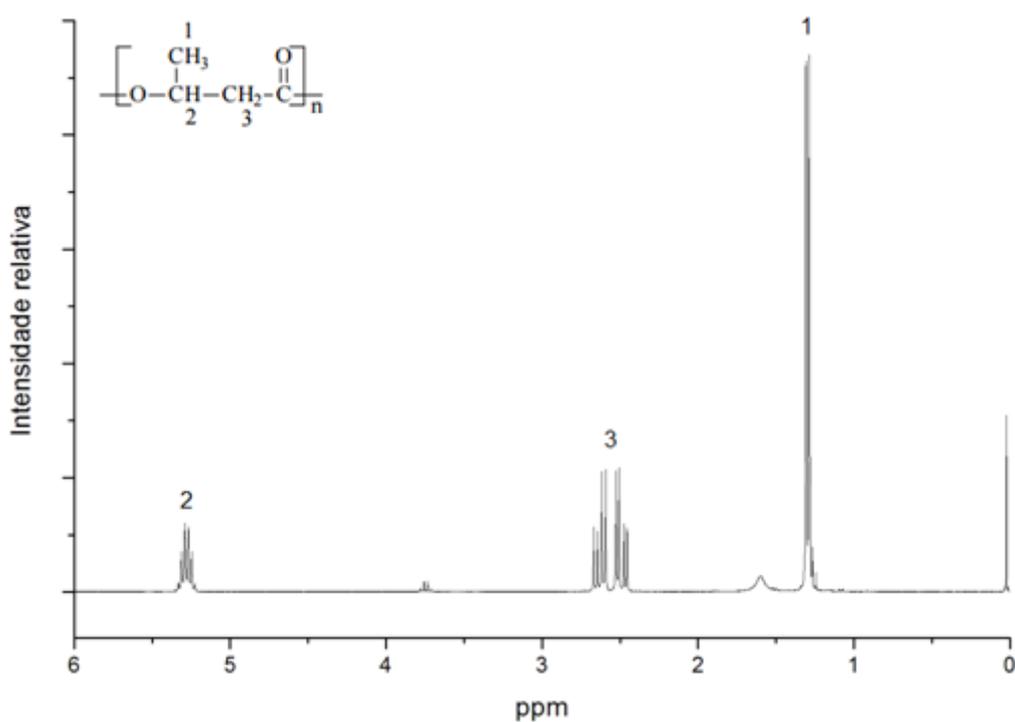


Figura 16. Espectro de RMN ^1H obtido para a amostra SG de P(3HB) em CDCl_3 .

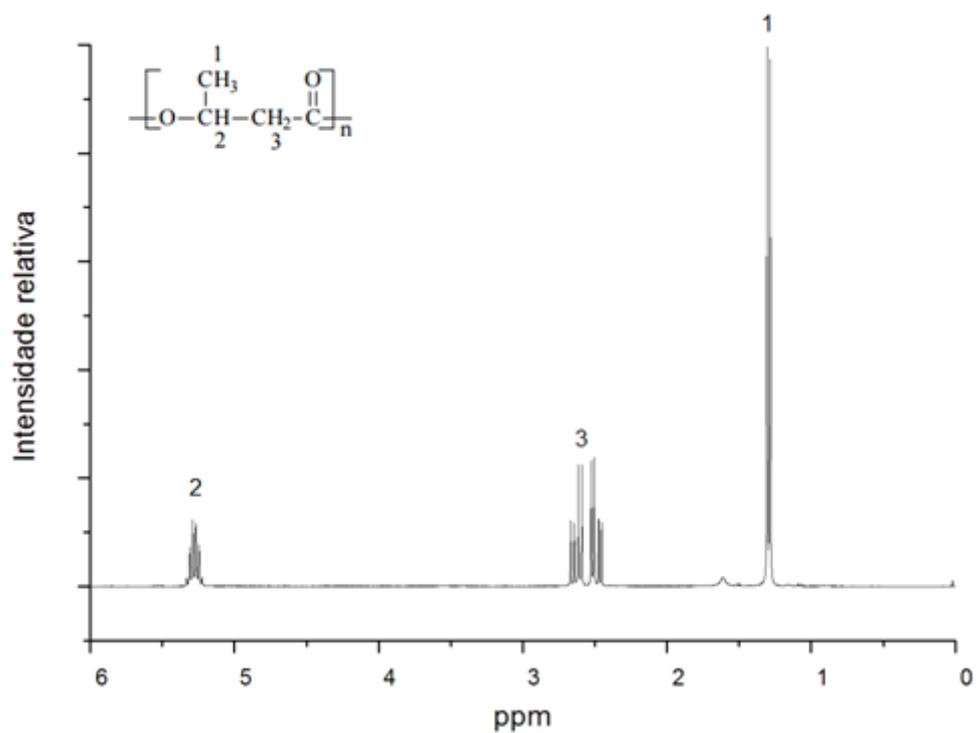


Figura 17. Espectro de RMN ^1H obtido para a amostra AG-FP de P(3HB) em CDCl_3 .

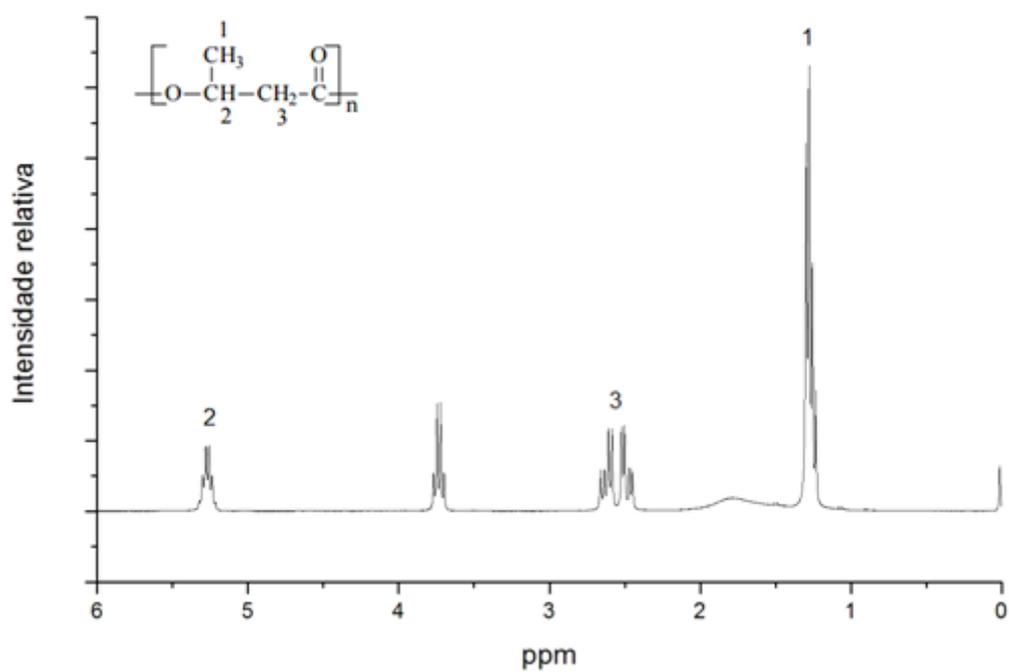


Figura 18. Espectro de RMN ^1H obtido para a amostra AG-IC de P(3HB) em CDCl_3 .

Tabela 11. Deslocamentos químicos característicos do P(3HB)

Atribuições	Deslocamento (ppm)			Literatura
	Amostra SG	Amostra AG-FP	Amostra AG-IC	
C-H	5,27	5,29	5,26	5,22 ⁽¹⁾ 5,25 ⁽²⁾
C-H ₂	2,51	2,52	2,50	2,52 ⁽¹⁾ 2,36-2,71 ⁽²⁾
CH ₃	1,28	1,28	1,28	1,28 ⁽¹⁾ 1,20 ⁽²⁾

⁽¹⁾CATONI, 2011.

⁽²⁾SIMON-COLIN *et al.*, 2008.

5.2.3 Análise termogravimétrica (TGA)

Na Figura 19 estão apresentadas as curvas de TGA dos polímeros sintetizados e na Tabela 12 estão relacionados os dados de temperatura de degradação (T_{onset}) e perda de massa determinadas a partir das curvas termogravimétricas (TG) e temperatura de degradação máxima (T_{pico}) obtidas através da primeira derivada das curvas termogravimétricas (DTG).

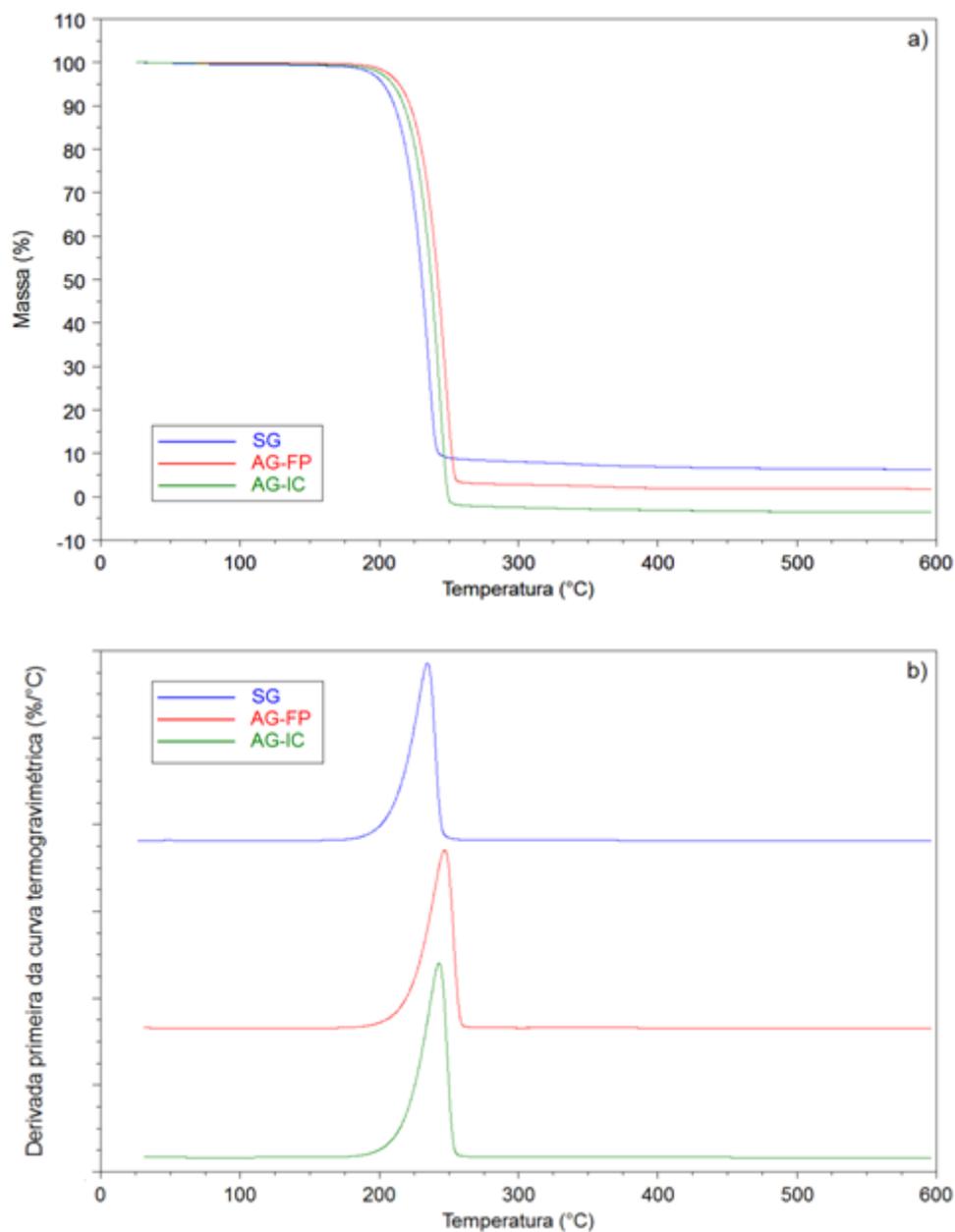


Figura 19. Curvas de TGA para os filmes de P(3HB) sintetizados sem glicerol (SG), com adição de glicerol na fase de produção (AG-FP) e com adição de glicerol no início do cultivo (AG-IC): a) termogravimetria (TG); b) termogravimetria derivada (DTG).

Tabela 12. Dados de perda de massa, T_{onset} e $T_{\text{máx}}$ obtidos das curvas de TG e DTG para as amostras SG, AG-FP e AG-IC.

Amostra	% perda de massa	T_{onset} (°C)	$T_{\text{máx}}$ (°C)
SG	91,2	211,5	234,6
AG-FP	96,9	222,3	246,9
AG-IC	100	218,8	243,0

Pode-se observar que todos os polímeros sintetizados apresentaram apenas um estágio de perda de massa, atribuído à decomposição do P(3HB), com valores de 91,2 % para SG, 96,9 % para AG-FP e 100 % para AG-IC. O grau de pureza dos polímeros, representado pela perda de massa, está relacionado com as propriedades do polímero. As impurezas são responsáveis por muitas das propriedades finais dos produtos acabados, como o grau de transparência, odor e brilho, além de contribuírem para cisões de cadeias poliméricas, acarretando em queda das propriedades termomecânicas (NASCIMENTO 2001 *apud* APATI 2012). Os polímeros apresentaram T_{onset} de 211,5 °C para a amostra SG; 222,2 °C para AG-FP e 218,9 °C para AG-IC, evidenciando menor estabilidade térmica em relação ao valor encontrado por Vogelsanger *et al.* (2004) para P(3HB) industrial que foi de 264,7 °C. A temperatura de degradação máxima apresentada pelas amostras foi de 234,6 °C para SG, 246,9 °C para AG-FP e 243 °C para AG-IC. Estes valores também foram inferiores aos encontrados por Duarte (2004) para o P(3HB) com massa molar igual a 240.000 g mol⁻¹, que apresentou $T_{\text{onset}} = 269,6$ °C e $T_{\text{máx}} = 288,1$ °C. No entanto, Apati (2012) já havia observado valores inferiores de estabilidade térmica tanto para P(3HB) sintetizado tendo apenas açúcar invertido como fonte de carbono ($T_{\text{onset}} = 242,8$ °C e $T_{\text{máx}} = 256,3$ °C), quanto para o polímero sintetizado com açúcar invertido e 15 g L⁻¹ de glicerol puro adicionado como cosubstrato ($T_{\text{onset}} = 242,7$ °C e $T_{\text{máx}} = 254,2$ °C).

5.2.4 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

Os termogramas de DSC obtidos para o primeiro e para o segundo aquecimento dos filmes de P(3HB) são mostrados na Figura 20. Na Tabela 13 são apresentados os resultados de temperatura de transição vítrea (T_g), determinadas a partir do segundo aquecimento, temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade (α_c), determinados a partir do primeiro aquecimento. O grau de cristalinidade foi calculado através da equação 8 (item 4.10.3).

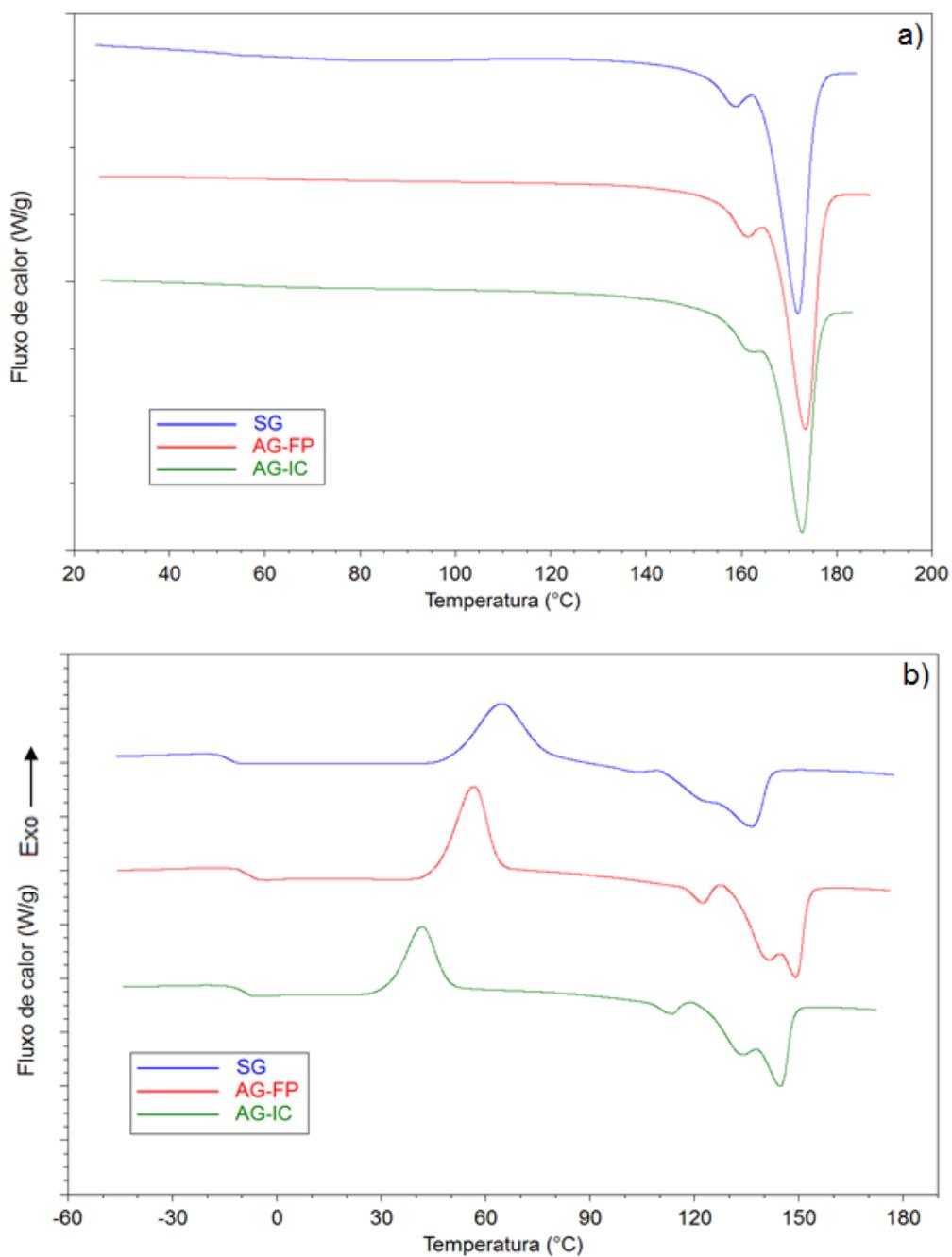


Figura 20. Curvas de DSC para os filmes de P(3HB) sintetizados sem glicerol (SG), com adição de glicerol na fase de produção (AG-FP) e com adição de glicerol no início do cultivo (AG-IC): a) primeiro aquecimento; b) segundo aquecimento.

Tabela 13. Dados de temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão cristalina (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) e grau de cristalinidade (α_c) para os polímeros sintetizados sem glicerol (SG) e com adição de glicerol puro na fase de produção (AG-FP) e no início do cultivo celular (AG-IC).

Amostra	T_g (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (J g ⁻¹)	α_c (%)
SG	-13,9	171,8	90,2	63,4
AG-FP	-7,6	173,4	91,3	64,3
AG-IC	-8,7	172,7	85,1	59,9

Os valores de T_m encontrados foram 171,8 °C para a amostra SG, 173,4 °C para AG-FP e 172,7 °C para AG-IC, valores muito próximos ao especificado na literatura para o P(3HB). Lima (2004) relata que a T_m do P(3HB) geralmente oscila entre 170 e 180 °C. O grau de cristalinidade determinado para as três amostras foi 63,4 % para SG, 64,3 % para AG-FP e 59,9 % para AG-IC, valores que estão de acordo com a literatura especificada para o P(3HB). Segundo Khanna e Srivastava (2005) o grau de cristalinidade do P(3HB) varia entre 60 e 80%.

O valor de T_g encontrado para os polímeros sintetizados apresentaram valor inferior ao especificado na literatura para o P(3HB), que pode variar entre -5 e 5 °C (ANDERSON E DAWES, 1990), sendo que a amostra SG (-13,9 °C) apresentou menor valor em relação aos polímeros produzidos com adição de glicerol (-7,6 °C para AG-FP e -8,7 °C para AG-IC), indicando a síntese de um polímero mais flexível em relação às amostras sintetizadas com adição de glicerol puro.

As amostras poliméricas sintetizadas nas estratégias de cultivo SG, AG-FP e AG-IC apresentaram propriedades características de P(3HB), evidenciadas pelos espectrogramas de FTIR, e também pelos valores de temperatura de fusão e grau de cristalinidade, obtidos pelas análises de DSC, sendo que a análise de RMN ¹H ratificou a síntese de P(3HB) a partir de *Cupriavidus necator*. No entanto, as amostras sintetizadas apresentam menor estabilidade térmica e temperatura de transição vítrea em relação ao que já foi publicado na literatura.

CONCLUSÕES

O uso de glicerol como cosubstrato para a produção de P(3HB) por *Cupriavidus necator* se mostrou viável, uma vez que este foi consumido durante todo o cultivo celular, tornando possível o seu aproveitamento como produto de maior valor agregado.

A avaliação dos ensaios em biorreator evidenciou que o acúmulo total de P(3HB) e de biomassa residual foram semelhantes para as três estratégias de cultivo, no entanto a produtividade em polímero e o acúmulo total de P(3HB) foram maiores para o cultivo com adição de glicerol purificado na fase de crescimento celular, já o parâmetro de conversão de substrato em biomassa foi mais elevado para os cultivos em que não houve a adição de glicerol, indicando que a presença de glicerol favorece a produção de polímero.

Foi possível observar ainda, em todos os cultivos, que o aumento da biomassa celular ocorreu até a limitação em nitrogênio, sendo que depois as células passaram a acumular o polímero de forma intracelular. No entanto, o acúmulo de P(3HB) durante a fase de crescimento também foi observado, alcançando valores superiores a 40 % em todos os cultivos.

Os parâmetros cinéticos que apresentaram diferença estatística significativa foram $Y_{Xt/S}$, com melhores resultados para o cultivo sem adição de glicerol e acúmulo (%) de P(3HB) com resultados mais significativos para a condição em que o glicerol foi adicionado no início do cultivo celular.

A caracterização das amostras evidenciou que os filmes poliméricos sintetizados em biorreator apresentaram propriedades semelhantes ao polímero P(3HB), sendo que nenhuma variação significativa foi observada nos polímeros sintetizados com ou sem adição de glicerol, indicando que o mesmo não alterou as propriedades térmicas do P(3HB).

Sugere-se que posteriormente sejam realizados estudos para avaliar a influência de utilizar inóculo em meio contendo glicerol como cosubstrato, bem como continuar os estudos em biorreator com diferentes estratégias de adição de glicerol para avaliar os parâmetros cinéticos envolvidos na síntese do polímero. Sugere-se ainda realizar análise de cromatografia de permeação em gel (GPC) para determinar

a massa molar das amostras de P(3HB) sintetizadas em cultivo de batelada alimentada com e sem a adição de glicerol como cosubstrato.

REFERÊNCIAS

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

APATI, G. P. **Síntese, caracterização e degradação de P(3HB) por *Cupriavidus necator*, utilizando glicerol como substrato**. Florianópolis. Tese de Doutorado (Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

ASENJO, J. A.; SCHMIDT, A. S.; ANDERSON, P. R.; ANDREWS, B. A.; Effect of single nutrient limitation on Poly- β -hydroxybutyrate molecular weight distribution in *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 46, p.497-502, 1995.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K; LIMA, D. P. Glicerol: um breve histórico e aplicações em sínteses estereosseletivas. **Química Nova**, v. 34(2), p.306-319, 2011.

BILLMEYER Jr, F. W. **Textbook of polymer science**. 3 ed. New York: John Wiley & Sons, 1984.

BIODIESELBR^a. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/biodiesel.htm>>. Acesso em: 02 julho 2014.

BIODIESELBR^b. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/noticias/usinas/glicerina/glicerina-residuo-biodiesel-pesquisas-040712.htm>>. Acesso em: 23 outubro 2014.

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.

BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTY, R. M. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in

microbial biomass. **European Journal of Applied Microbiology Biotechnology**, v. 6(1), p.29-37, 1978.

CALVÃO, P. S. **Obtenção e caracterização de misturas do polímero biodegradável P(3HB) e seu copolímero P(3HB-co-3HV) com elastômeros**. São Paulo. Tese de Doutorado (Engenharia Metalúrgica e de Materiais), Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2009.

CAMPBELL, D. & WHITE, J. R. **Polymer Characterization**. London: Chapman & Hall, 1989.

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

CATONI, S. E. M. **Biossíntese e obtenção de PHB e PHBV plastificados com PEG visando aplicação em liberação controlada de fármacos**. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Processos), Universidade da Região de Joinville, 2011.

CAVALHEIRO, J. M. B. T.; ALMEIDA, M. C. M. D.; GRANDFILS, C; FONSECA, M. M. R. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. **Process Biochemistry**, v. 44, p.509-515, 2009.

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

CHAI, H-L; AHMAD, R.; YAHYA, A. R. M.; MAJID, M. I. A.; AMIRUL, A. A. Microbial synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer by *Cupriavidus sp.* USMAA2-4 through a two step cultivation process. **African Journal of Biotechnology**, v. 8(17), p.4189-4196, 2009.

CIRIMINNA, R; DELLA PINA, C; ROSSI, M e PAGLIARO, M. Understanding the glycerol market. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.116(10), p.1432-1439, 2014.

DALAL, J.; SARMA, P. M.; MANDAL, A. K.; LAL, B. Response surface optimization of poly (3-hydroxyalkanoic acid) production using oleic acid as an alternative carbon source by *Pseudomonas aeruginosa*. **Biomass and Bioenergy**, v. 54, p.67-76, 2013.

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

DALL'ALBA, K. **Uma alternativa para a glicerina oriunda da produção do biodiesel: preparo de polióis e aplicação em adesivos poliuretânicos**. Dissertação de Mestrado (Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

DIXON'S Q-TEST: DETECTION OF A SINGLE OUTLIER. Departamento de Química da Universidade de Atenas. Disponível em: <http://www.chem.uoa.gr/cations/applets/appletqtest/text_qtest2.htm> Acesso em: ago. de 2013.

DOELLE, H. W. Bacterial metabolism. New York: Academic Press, 1975.

DOI, Y.; KUNIOKA, M.; NAKAMURA, Y.; SOGA, K. ^1H and ^{13}C NMR Analysis of Poly(3-hydroxybutyrate) Isolated from *Bacillus megaterium*. **Macromolecules**, v. 19, p. 1274-1276, 1986.

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

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

FORMOLO, M. C.; DUARTE, M. A. T.; SCHNEIDER, A. L.; FURLAN, S. A.; PEZZIN, A. P. T. Poliidroxialcanoatos: biopoliésteres produzidos a partir de fontes renováveis. **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal**, v. 4, n. 2, dez. 2003.

FUKUI, T.; DOI, Y. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p.333-336, 1998.

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

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.

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

HGCA - HOME-GROWN CEREALS AUTHORITY – (2006). **Impact of Biodiesel Production on the Glycerol Market.** Disponível em: <http://publications.hgca.com/publications/documents/Impact_of_Biodiesel_Production_on_the_Glycerol_Market.pdf>. Acesso em: 23 outubro 2014.

IENCZAK, J. L.; SCHMIDELL, W.; ARAGÃO, G. M. F. High-cell-density culture strategies for polyhydroxyalkanoate production: a review. **Journal of industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 40, p.275-286, 2013.

KACHRIMANIDOU, V.; KOPSAHELIS, N.; PAPANIKOLAOU, S.; KOOKOS, I. K.; DE BRUYN, M.; CLARK, J. H.; KOUTINAS, A. A. Sunflower-based biorefinery: Poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production from crude glycerol, sunflower meal and levulinic acid. **Bioresource Technology**, v. 172, p.121-130, 2014.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, p.607–619, 2005.

LARRAÑAGA, A; FERNÁNDEZ, J.; VEGA, A.; ETXEBERRIA, A.; RONCHEL, A.; ADRIO, J. L.; SARASUA, J. R. Crystallization and its effect on the mechanical properties of a medium chain length polyhydroxyalkanoate. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 39, p.87-94, 2014.

LARSEN, A. C. **Co-digestão anaeróbia de glicerina bruta e efluente de fecularia**. Dissertação de Mestrado (Engenharia Agrícola), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2009.

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

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

LEIBNIZ INSTITUTE DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. Disponível em: <http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-545.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=304>. Acesso em 02 fevereiro 2015.

LEONG, Y. K.; SHOW, P. L.; OOI, C. W.; LIG, T. C.; LAN, J. C-W. Current trends in polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis: Insights from the recombinant *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 180, p.52-65, 2014.

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

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

MARANGONI, C.; FURIGO Jr., A.; ARAGÃO, G. M. F. The influence of substrate source on the growth of *Ralstonia eutropha*, aiming at the production of polyhydroxyalkanoate. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 18, p.175-180, 2001.

MARTINEZ, G. A.; BERTIN, L.; SCOMA, A.; REBECCHI, S.; BRAUNEGG, G.; FAVA, F. Production of polyhydroxyalkanoates from dephenolised and fermented olive mill wastewaters by employing a pure culture of *Cupriavidus necator*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 97, p.92-100, 2015.

MENDES, D. B.; SERRA, J. C. V. Glicerina: uma abordagem sobre a produção e o tratamento. **Revista Liberato**, v. 13(20), p.1-9, 2012.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31 (3), p. 426-428, 1959.

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

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

MOZUMDER, Md. S. I.; WEVER, H.; VOLCKE, E. I. P.; GARCIA-GONZALEZ, Linsey. A robust fed-batch feeding strategy independent of the carbon source for optimal polyhydroxybutyrate production. **Process Biochemistry**, v. 49, p.365-373, 2014.

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

Princípios da Ressonância Magnética Nuclear e Aplicações em Frutas e Hortaliças. Disponível em: <<http://poscolheita.cnpdia.embrapa.br/ressonancia-magnetica-nuclear>>. Acesso em: 28 abril 2015.

PORTAL BRASIL. Disponível em: < <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2014/05/governo-aumenta-porcentagem-de-biodiesel-no-diesel>>. Acesso em: 04 fevereiro 2015.

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

PRAZERES, L.; GRIGULL, V. H.; GARCIA, M. C. F.; DUEK, E. A. R.; SCHNEIDER, A. L. S.; PEZZIN, A. P. T. Avaliação da miscibilidade de blendas de poli(p-dioxanona) e poli(3-hidroxibutirato).. In: Congresso Brasileiro de Polímeros - CBPol, 2007, Campina Grande. 9º Congresso Brasileiro de Polímeros - 9º CBPol, vol. 499, p.1-10, 2007.

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

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

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

REUTZ, I.; SCHOBERT, P.; BOWIEN, B. Effect of phosphoglycerate mutase deficiency metabolism of *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of Bacteriology**, v. 151, p.8-14, 1982.

RIBEIRO, F. Z. **Avaliação da qualidade de frutas por Ressonância Magnética Nuclear em baixa resolução**. São Carlos. Dissertação de Mestrado (Ciências – Química Analítica), Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2008.

RINALDI, R; GARCIA, C.; MARCINIUK, L. L.; ROSSI, A. V.; SCHUCHARDT, U. Síntese de biodiesel: uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. **Química Nova**, v. 30(5), p.1374-1380, 2007.

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

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

SILVA, M. L. **Obtenção de derivados químicos de produtos naturais empregando catálise convencional e enzimática**. Tese de Doutorado (Química), Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5. Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SIMON-COLIN, C.; RAGUÉNÈS, G.; COZIEN, J.; GUEZENNEC, J. G. *Halomonas profundus* sp. nov., a new PHA-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp. **Journal of Applied Microbiology**. v. 104, p. 1425-1432, 2008.

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

SPOLJARIĆ, I. V.; LOPAR, M.; KOLLER, M.; MUHR, A.; SALERNO, A.; REITERER, A.; HORVAT, P. *In silico* optimization and low structured kinetic model of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] synthesis by *Cupriavidus necator* DSM 545 by *fed-batch* cultivation on glycerol. **Journal of biotechnology**, v. 168(4), p.625-635, 2013.

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

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

TACIRO, M. K. **Processo contínuo de produção de polihidroxialcanoatos de cadeia média (PHAMCL) sob limitação múltipla de nutrientes**. Tese de Doutorado (Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

UMPIERRE, A. P.; MACHADO, F. Gliceriquímica e Valorização do Glicerol. **Revista Virtual de Química**, v. 5 (1), p.106-116, 2013.

VANZIN, C. **Estudo da biossíntese de Poli-3-Hidroxi-butirato-co-Hidroxi-alcanoatos de Cadeia Média (P3HB-co-3HAMcl) a partir de ácidos**

graxos livres e óleo vegetal. Tese de Doutorado (Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

VASCONCELOS, Y. Plástico de açúcar. FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. **Revista Pesquisa Fapesp.** Edição 80, 2002. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2002/10/01/plastico-de-acucar/>>. Acesso em: 18 fevereiro 2015.

VIEGAS, C. P. R. **Estudo da produção de polihidroxicanoatos (PHAs) por *Chromobacterium violaceum*.** Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

VOGELSANGER, N.; FORMOLO, M. C.; PEZZIN, A. P. T.; SCHNEIDER, A. L. S.; FURLAN, S. A.; BERNARDO, H. P.; PEZZIN, S. H. PIRES, A. T. N.; DUEK, E. A. R. Blendas Biodegradáveis de Poli(3-Hidroxiбутирато)/Poli(ε-Caprolactona): Obtenção e Estudo da Miscibilidade. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p.p. 359-365, 2003.

VOGELSAGER, JR. N.; FURLAN, S.A.; SCHNEIDER, A. L. S.; PIRES, A. T. N.; PEZZIN, S.H.; PEZZIN, A.P.T. Filmes de P(3HB) e PCL: Acompanhamento da Biodegradação em Solo por Propriedades Térmicas e Morfológicas. **Revista Matéria**, v. 9, n. 4, p.370-377, 2004.

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

WANG, Z.-Y.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B. A. Glycerol production by microbial fermentation: A review. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 201–223, 2001.

WENDLANDT, W. W.; GALLAGHER, P. K. *In*: TURI, E.A. **Thermal Characterisation of Polymeric Materials.** Orlando: Academic Press, 1981.

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

ANEXO A – Curva padrão para determinação da concentração de açúcares redutores

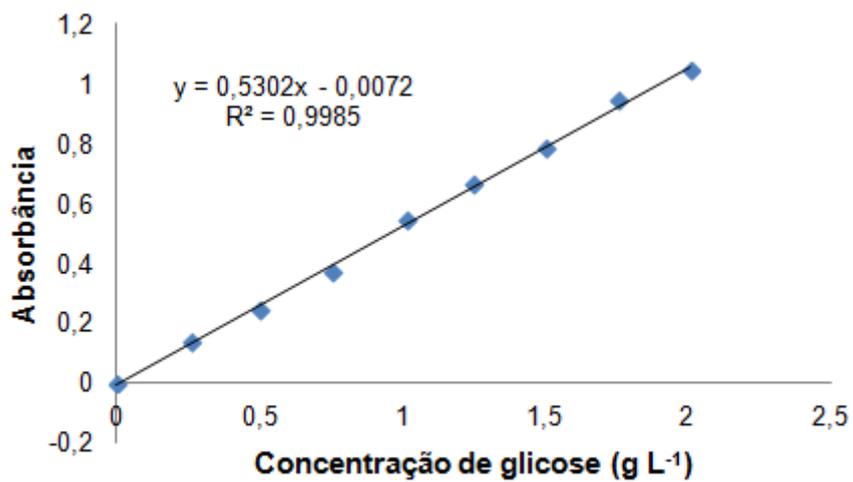


Figura 21. Curva padrão de glicose para determinação da concentração de açúcar invertido.

Anexo B – Evolução da concentração de nitrogênio

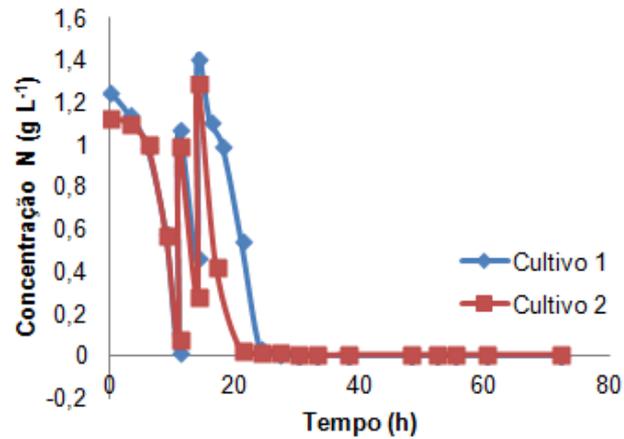


Figura 22. Gráfico da concentração de nitrogênio dos ensaios realizados sem adição de glicerol.

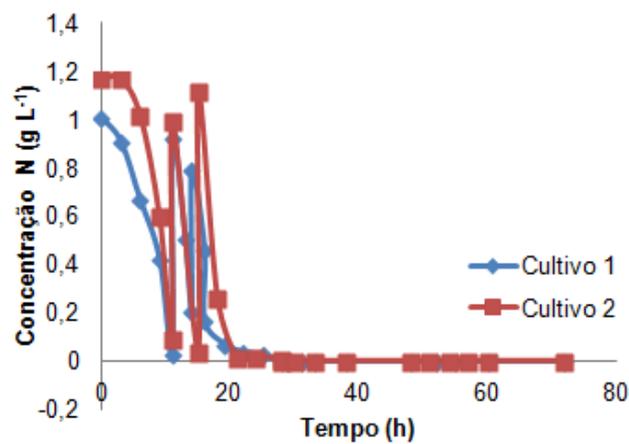


Figura 23. Gráfico da concentração de nitrogênio dos ensaios realizados com adição de 20 g L⁻¹ de glicerol na fase de produção do polímero.

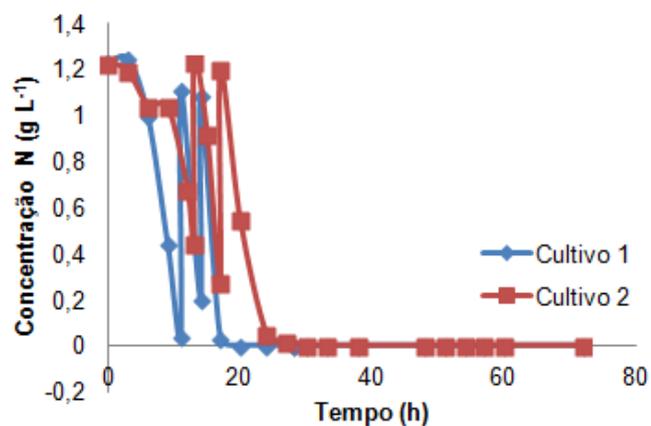


Figura 24. Gráfico da concentração de nitrogênio dos ensaios realizados com adição de 20 g L⁻¹ de glicerol no início do cultivo.

Anexo C – Gráficos de consumo de substrato

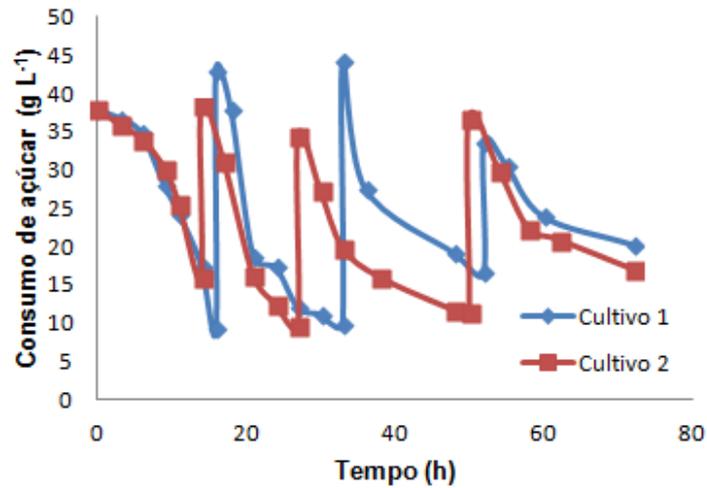


Figura 25. Gráfico de consumo de açúcar invertido dos ensaios realizados sem adição de glicerol.

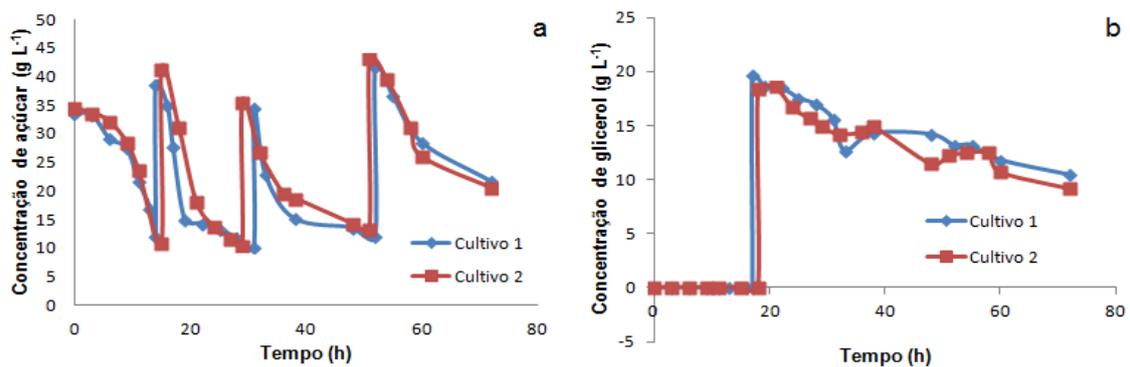


Figura 26. Gráficos de consumo de substrato dos ensaios realizados com adição de 20 g L^{-1} de glicerol na fase de produção do polímero. (a) consumo de açúcar invertido e (b) consumo de glicerol.

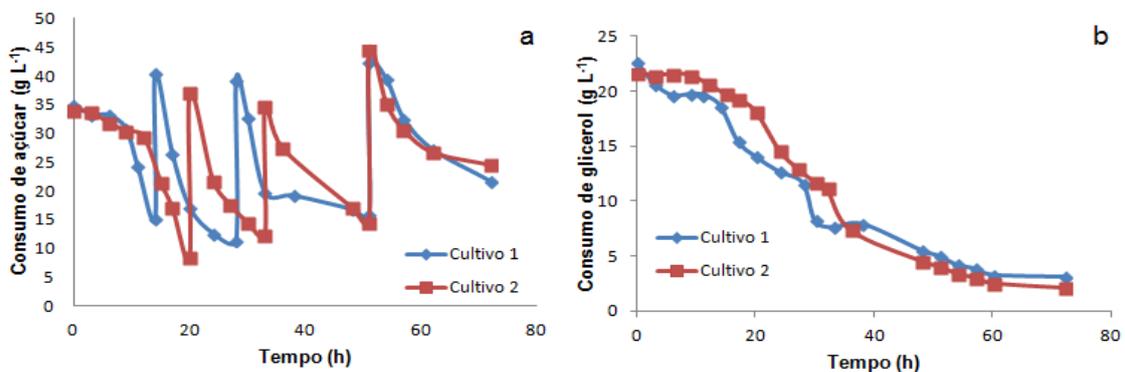


Figura 27. Gráficos de consumo de substrato dos ensaios realizados com adição de 20 g L^{-1} de glicerol na fase de crescimento celular. (a) consumo de açúcar invertido e (b) consumo de glicerol.

Anexo D – Análise estatística dos parâmetros cinéticos

Tabela 14. Teste t de Student para biomassa residual (X_r).

Variável	Média	Desvio padrão	N	Graus de liberdade	F	p (<0,05)
SG AG-FP	17,65 14,31	1,64 0,65	2	2	2,676	0,1158
SG AG-IC	17,65 12,48	1,64 1,13	2	2	3,669	0,0669
AG-FP AG-IC	14,31 12,48	0,65 1,13	2	2	1,983	0,1858

Tabela 15. Teste t de Student para concentração total de P(3HB).

Variável	Média	Desvio padrão	N	Graus de liberdade	F	p (<0,05)
SG AG-FP	21,54 21,29	2,383 1,541	2	2	0,127	0,9105
SG AG-IC	21,54 24,58	2,383 1,789	2	2	-1,442	0,2858
AG-FP AG-IC	21,29 24,54	1,541 1,789	2	2	-1,973	0,1872

Tabela 16. Teste t de Student para produtividade em célula (P_{Xr}).

Variável	Média	Desvio padrão	N	Graus de liberdade	F	p (<0,05)
SG AG-FP	0,53 0,53	0,045 0,006	2	2	1,768	0,8209
SG AG-IC	0,53 0,49	0,045 0,018	2	2	6,075	0,4907
AG-FP AG-IC	0,53 0,49	0,006 0,018	2	2	10,743	0,3770

Tabela 17. Teste t de Student para produtividade global em polímero ($P_{gP(3HB)}$).

Variável	Média	Desvio padrão	N	Graus de liberdade	F	p (<0,05)
SG AG-FP	0,30 0,30	0,035 0,021	2	2	0,884	0,9405
SG AG-IC	0,30 0,34	0,035 0,025	2	2	-1,438	0,2869
AG-FP AG-IC	0,30 0,34	0,021 0,025	2	2	-1,974	0,1871

Tabela 18. Teste t de Student para fator de conversão de substrato em polímero ($Y_{P(3HB)/S}$).

Variável	Média	Desvio padrão	N	Graus de liberdade	F	p (<0,05)
SG AG-FP	0,22 0,20	0,010 0,005	2	2	2,011	0,1821
SG AG-IC	0,22 0,22	0,010 0,013	2	2	-0,191	0,8659
AG-FP AG-IC	0,20 0,22	0,005 0,013	2	2	-1,928	0,1936

Tabela 19. Teste t de Student para fator de conversão de substrato em células na fase de crescimento ($Y_{Xr/S \text{ cresc}}$).

Variável	Média	Desvio padrão	N	Graus de liberdade	F	p (<0,05)
SG AG-FP	0,22 0,19	0,013 0,018	2	2	1,759	0,2206
SG AG-IC	0,22 0,17	0,013 0,013	2	2	3,237	0,0836
AG-FP AG-IC	0,19 0,17	0,018 0,013	2	2	0,917	0,4558

Tabela 20. Teste t de Student para fator de conversão de substrato em produto na fase de produção ($Y_{P(3HB)/S \text{ prod}}$).

Variável	Média	Desvio padrão	N	Graus de liberdade	F	p (<0,05)
SG AG-FP	0,23 0,22	0,0009 0,002	2	2	3,556	0,0708
SG AG-IC	0,23 0,26	0,0009 0,029	2	2	-1,345	0,3107
AG-FP AG-IC	0,22 0,26	0,002 0,029	2	2	-1,685	0,2339

Tabela 21. Teste t de Student para velocidade máxima de crescimento celular (μ_{\max}).

Variável	Média	Desvio padrão	N	Graus de liberdade	F	p (<0,05)
SG AG-FP	0,16 0,18	0,03 0,003	2	2	-0,858	0,4814
SG AG-IC	0,16 0,16	0,03 0,024	2	2	-0,216	0,8488
AG-FP AG-IC	0,18 0,16	0,003 0,024	2	2	0,647	0,5841