



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO TECNOLÓGICO

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS

CARACTERIZAÇÃO DE POLI (3-HIDROXIBUTIRATO) PRODUZIDO  
POR *Cupriavidus necator* A PARTIR DE GLICEROL E GLICOSE

Thaís Rocha Guimarães

Florianópolis – SC

2017



THAÍS ROCHA GUIMARÃES

CARACTERIZAÇÃO DE POLI (3-HIDROXIBUTIRATO) PRODUZIDO  
POR *Cupriavidus necator* A PARTIR DE GLICEROL E GLICOSE

Projeto apresentado na Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso ao Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel no Curso de Engenharia de Alimentos.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gláucia Maria Falcão de Aragão.

**Coorientadora:** Dr<sup>a</sup> Kellen Zanfonato

Florianópolis - SC

2017



THAÍS ROCHA GUIMARÃES

CARACTERIZAÇÃO DE POLI (3-HIDROXIBUTIRATO) PRODUZIDO  
POR *Cupriavidus necator* A PARTIR DE GLICEROL E GLICOSE

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel no Curso de Engenharia de Alimentos”, e aprovado em sua forma final pelo Programa de Graduação da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 04 de Julho de 2017.

---

Prof. Marcelo Lanza, Dr.

Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Gláucia Maria Falcão de Aragão, Dr.<sup>a</sup>

Orientadora

Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Adriano da Silva, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

---

Pâmela Guder Goularte, MsC

Universidade Federal de Santa Catarina



Dedico este trabalho à minha família, aos integrantes do grupo PHB e aos meus colegas de classe.





## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, pela vida, saúde e força para superar as dificuldades.

À minha família, pelo incentivo e apoio eternos. Muito obrigada por sempre acreditarem em mim, mesmo quando eu duvido.

À minha orientadora, Gláucia, por ter me dado a oportunidade de trabalhar em um ambiente tão estimulante e possibilitar a realização deste trabalho. Você tem meu respeito, admiração e gratidão.

À minha coorientadora Kellen, por aceitar fazer parte deste trabalho, me auxiliando em todos os momentos necessários. Serei eternamente grata pelos ensinamentos e pelos momentos vivenciados no laboratório ENGEBIO.

Aos laboratórios: Central de Análises – EQA, Laboratório de Controle de Processos (LCP), Laboratório de Físico-Química – QMC e Laboratório de Tratamento Biológico de Resíduos (LTBR), por todo suporte e auxílio nas análises aqui apresentadas.

Ao grupo PHB, por todo apoio, amizade, companhia, conversas e momentos de alegria, que tornaram meus dias no ENGEBIO mais felizes. Um agradecimento especial à Pâmela, que sempre esteve disposta a me ajudar e a descontrair quando era possível.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem avaliar este trabalho e pelas importantes contribuições.

Por fim, a todos que, de alguma forma, contribuíram ou torceram pelo sucesso deste trabalho e da minha graduação.

Eternamente grata.



“Quando algo vai mal, e isso acontece na vida,  
quando a estrada a percorrer parece enorme subida,  
quando o dinheiro é pouco e a dívida aumenta,  
e você quer sorrir, mas não pode, e se lamenta  
quando a ansiedade o faz um autista,  
descanse um pouco, mas não desista.

A vida corre estranha, ora embaixo, ora no alto,  
como todos, aprendemos a cada sobressalto,  
e muitos daqueles que se deixam derrotar  
seriam vencedores se aprendessem a lutar.  
Não desista, mesmo andando sem nenhuma rapidez,  
talvez obtenha sucesso se apenas tentar outra vez.

O objetivo pode estar perto, mas distante  
do homem sem coragem e hesitante;  
há lutadores que desistem antes da luta  
e nunca sabem se venceriam a disputa;  
e só quando é tarde e nada mais podem fazer,  
descobrem o quanto estavam perto de vencer.

O sucesso é o fracasso às avessas,  
a cor escura de incertezas pregressas,  
a certeza de estar próximo é algo incerto,  
pode parecer longe e, entretanto, estar perto.  
Então, nunca desanime, nem com a dor mais imprevista,  
e nos piores momentos, diga a si mesmo: "Não desista!"

(Paul Hannah, 2004)



## RESUMO

O glicerol, principal subproduto da produção do biodiesel, é amplamente produzido, sendo necessário encontrar utilizações comerciais para essa produção. Uma delas é sua utilização como substrato para cultivos de microrganismos. O poli(3-hidroxi-butirato) (P(3HB)) é um poliéster natural e biodegradável, produzido e armazenado como reserva energética por diversos microrganismos. Como é um produto intracelular, o P(3HB) deve ser recuperado das células no final do cultivo, podendo ter uma composição diferente dependendo do microrganismo, a fonte de carbono e as condições de cultura empregadas. O objetivo deste estudo foi extrair e caracterizar o P(3HB) produzido por *Cupriavidus necator\_glpFK*, a partir de glicerol e de glicerol e glicose associados e comparar os resultados aos obtidos a partir de glicose, bem como com o biopolímero comercial. As seguintes análises foram realizadas na caracterização: espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), viscosidade, análise termogravimétrica (TGA), calorimetria diferencial de varredura ou calorimetria exploratória diferencial (DSC). O solvente carbonato de propileno, recuperado de outras extrações, foi utilizado. Os melhores resultados obtidos para pureza e recuperação do P(3HB) foram de 95 e 86%, respectivamente, para o polímero produzido a partir de glicerol. A análise de FTIR comprovou ser o P(3HB) os polímeros extraídos dos dois substratos. Não houve diferença significativa na massa molar média, de 5,8 e 5,9 x10<sup>4</sup> g.mol<sup>-1</sup>, utilizando glicerol ou glicerol e glicose como substratos, respectivamente, porém seus valores foram inferiores àqueles relatados para biopolímeros comerciais. A análise de TGA e DSC avaliaram as propriedades térmicas dos polímeros, as quais foram semelhantes para os dois substratos estudados, com valores de T<sub>onset</sub> e T<sub>peak</sub> iguais (266,43 e 291,26 °C, respectivamente) e T<sub>m</sub> e X<sub>c</sub> aproximados (170,27 e 169,00 °C (T<sub>m</sub>) e 61,93 e 59,29% (X<sub>c</sub>)). Foi possível constatar que o uso do glicerol não afetou a estabilidade dos polímeros quanto às propriedades térmicas, e que o carbonato de propileno pode ser reutilizado no processo de extração. A produção deste biopolímero com um subproduto, como o glicerol, e a sua extração com o solvente reaproveitado pode contribuir para a redução dos custos totais de produção do P(3HB).

**Palavras-chave:** Carbonato de propileno; *Cupriavidus necator*; extração; glicerol; Poli(3-hidroxi-butirato).



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura geral dos PHAs.....	29
Figura 2 – Imagens de microscopia de transmissão eletrônica de P(3HB) em <i>C. necator</i> selvagem nos tempos de 2,5 h (A), 5 h (B), 9 h (C), e 24 h (D). Tamanho da barra: 0,5 $\mu$ m. .	31
Figura 3 – Fluxograma geral das etapas de produção, extração e caracterização do P(3HB) por <i>Cupriavidus necator</i> . .....	37
Figura 4 – Espectro de FTIR para as amostras de P(3HB) extraídas de <i>C. necator_glpFK</i> com os diferentes substratos: A = glicerol e B = glicerol e glicose. ....	46
Figura 5 – Curva de viscosidade reduzida como função da concentração das soluções das amostras de P(3HB): extraídas de <i>C. necator_glpFK</i> com os diferentes substratos: (■) glicerol e (●) glicerol e glicose; e (◆) do polímero comercial da PHB Industrial. ....	49
Figura 6 – Curvas de TGA, termogravimetria e termogravimetria derivada, das amostras de P(3HB) extraídas de <i>C. necator_glpFK</i> com os diferentes substratos: A = glicerol e B = glicerol e glicose. ....	51
Figura 7 – Curvas de DSC para as amostras de P(3HB) extraídas de <i>C. necator_glpFK</i> com os diferentes substratos: A = glicerol e B = glicerol e glicose. ....	53





## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre as propriedades do P(3HB) comercial e do PP.....	32
Tabela 2 – Aplicações possíveis do P(3HB) por processo, indústria e produtos. ....	36
Tabela 3 – Preparo das soluções poliméricas para medidas de viscosidade relativa. ....	42
Tabela 4 – Definições de viscosidades utilizadas.....	43
Tabela 5 – Dados utilizados para a determinação de P(3HB) e resultados de recuperação e pureza de P(3HB) obtidos para as amostras dos biopolímeros extraídos de <i>C. necator_glpFK</i> com os diferentes substratos: A = glicerol e B = glicerol e glicose. ....	45
Tabela 6 – Bandas características no espectro de FTIR para os dois P(3HB)’s extraídos.....	47
Tabela 7 – Resultados das viscosidades intrínsecas e da massa molar média para os três polímeros analisados: polímeros obtidos (A) utilizando glicerol como substrato, (B) glicerol e glicose como substrato, e (C) polímero comercial da PHB Industrial. ....	48
Tabela 8 – Resultados de temperatura de início de degradação (Tonset), temperatura máxima de degradação (Tpeak) e porcentagem de perda de massa determinados a partir das curvas de TGA das amostras de P(3HB) extraídas com os diferentes substratos: A = glicerol e B = glicerol e glicose. ....	50
Tabela 9 – Resultados de temperatura de fusão (Tm), temperatura de transição vítrea (Tg), grau de cristalinidade (Xc), e entalpias de fusão ( $\Delta H_m$ ), de cristalização ( $\Delta H_c$ ) e de fusão considerando o polímero 100 % cristalino ( $\Delta H_m0$ ) obtidos por DSC, para os dois P(3HB) extraídos de <i>C. necator_glpFK</i> com os diferentes substratos: A = glicerol e B = glicerol e glicose.....	53



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

P(3HB) – poli (3-hidroxi-butirato)

FTIR – espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier

DSC – calorimetria diferencial de varredura ou calorimetria exploratória diferencial

TGA – análise termogravimétrica

GPC – cromatografia de permeação em gel

PE – polietileno

PP – polipropileno

PS – poliestireno

PET – politereftalato de etileno

PVC – policloreto de vinila

PHAs – poli-hidroxi-alcenoatos

PHAS<sub>CL</sub> – poli-hidroxi-alcenoatos de cadeia curta

PHAM<sub>CL</sub> – poli-hidroxi-alcenoatos de cadeia média

P(4HB) – poli(4-hidroxi-butirato)

P(3HV) – poli(3-hidroxi-valerato)

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

P(3HHx) – poli(3-hidroxi-hexanoato)

P(3HO) – poli(3-hidroxi-octanoato)

P(3HHx-*co*-3HO) – poli(3-hidroxi-hexanoato-*co*-3-hidroxi-octanoato)

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada

T<sub>g</sub> – temperatura de transição vítrea

TNT – Tecido não tecido

HA – hidroxiapatita

DTA – análise térmica diferencial

SEC – cromatografia de exclusão por tamanho

FDA – *Food and Drug Administration*

CG – cromatografia gasosa

$m_{P(3HB)}$  – massa de biopolímero detectada por cromatografia (g)

$m_T$  – massa do material extraído utilizado para a análise cromatográfica (g)

$m_P$  – massa de P(3HB) puro (g)

$m_f$  – massa de P(3HB) obtida após a extração (g).

$m_i$  – massa total de P(3HB) nas células antes da extração (g), determinado por CG

$V_{sol.conc.}$  – volume de solução concentrada do balão volumétrico de 100 mL utilizada (mL)

$V_{solvente}$  – volume de clorofórmio adicionado em cada diluição (mL)

$V_{final}$  – volume final de cada diluição (mL)

$c$  – concentração de P(3HB) nas soluções para análise de viscosidade ( $g \cdot mL^{-1}$ )

$t_0$  – tempo requerido para o escoamento do solvente puro (s)

$t$  – tempo requerido para que cada solução polimérica passe através do tubo capilar (s)

$\eta$  – viscosidade das soluções poliméricas ( $mL \cdot g^{-1}$ )

$\eta_0$  – viscosidade do solvente puro ( $mL \cdot g^{-1}$ )

$\rho$  – densidade específica da solução ( $kg \cdot m^{-3}$ )

$\rho_0$  – densidade específica do solvente puro ( $kg \cdot m^{-3}$ )

$\overline{M}_v$  – massa molar média dos polímeros ( $g \cdot mol^{-1}$ )

$\eta_{rel}$  – viscosidade relativa ( $mL \cdot g^{-1}$ )

$\eta_{sp}$  – viscosidade específica ( $mL \cdot g^{-1}$ )

$\eta_{red}$  – viscosidade reduzida ( $mL \cdot g^{-1}$ )

$\eta_i$  – viscosidade intrínseca ( $mL \cdot g^{-1}$ )

$K$  – constante da equação de Mark-Howink-Sakurada ( $mL \cdot g^{-1}$ )

$a$  – constante da equação de Mark-Howink-Sakurada

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

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

$\Delta H_{\text{m}}$  – entalpia de fusão da amostra ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )

$\Delta H_{\text{c}}$  – entalpia de cristalização da amostra ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ )

$\Delta H_{\text{m}}^0$  – entalpia de fusão considerando o polímero 100 % cristalino ( $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

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

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

$X_{\text{c}}$  – grau de cristalinidade (%)

$T_{\text{c}}$  – temperatura de cristalização ( $^{\circ}\text{C}$ )



## SUMÁRIO

<b>DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO.....</b>	<b>23</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
1.1 OBJETIVOS.....	27
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>28</b>
2.1 POLI-HIDROXIALCANOATOS (PHAs).....	28
2.2 POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) (P(3HB)).....	29
<b>2.2.1 Produção de P(3HB).....</b>	<b>30</b>
2.3 PROPRIEDADES DO P(3HB).....	32
2.4 EXTRAÇÃO DE P(3HB).....	33
2.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE POLÍMEROS.....	34
2.6 APLICAÇÕES DE P(3HB).....	35
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
3.1 BIOMASSA.....	38
<b>3.1.1 Tratamento da biomassa.....</b>	<b>38</b>
3.3 EXTRAÇÃO DE P(3HB) COM CARBONATO DE PROPILENO.....	39
3.4 DETERMINAÇÃO DE P(3HB).....	40
3.5 CARACTERIZAÇÃO DE P(3HB).....	41
<b>3.5.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....</b>	<b>42</b>
<b>3.5.2 Viscosidade.....</b>	<b>42</b>
<b>3.5.3 Análise termogravimétrica (TGA).....</b>	<b>44</b>
<b>3.5.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....</b>	<b>44</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
4.1 DETERMINAÇÃO DE P(3HB).....	45

4.2 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	46
4.3 VISCOSIDADE.....	48
4.4 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA).....	50
4.5 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	52
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>57</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>



## DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

**Caracterização de Poli(3-hidroxiбутирато) produzido por *Cupriavidus necator* a partir de glicerol e glicerol e glicose associados.**

### **Por quê?**

- Há poucos relatos na literatura quanto à caracterização de P(3HB) produzido por cultura bacteriana, a partir do glicerol. O presente trabalho pretende contribuir com informações sobre as propriedades físico-químicas e térmicas do P(3HB) produzido pela bactéria *C. necator\_glpFK* a partir do glicerol e glicerol e glicose associados.
- O glicerol é um substrato de baixo custo. Além disso, há controvérsias na literatura quanto à massa molar de P(3HB) produzido a partir glicerol como substrato. Portanto, o presente trabalho pretende obter dados sobre recuperação, pureza e características físico-químicas do polímero produzido por glicerol e comparar com a literatura.
- Ainda não há estudos sobre a caracterização do P(3HB) produzido pelo uso de glicerol e glicose como substratos associados pela bactéria *C. necator\_glpKF*.

### **Método experimental**

- Tratamento da biomassa com método térmico.
- Recuperação de P(3HB) utilizando o solvente carbonato de propileno.
- Determinação dos percentuais de recuperação e pureza do P(3HB).
- Caracterização do P(3HB) através das seguintes análises: GPC, FTIR, viscosidade, TGA e DSC.



## 1 INTRODUÇÃO

Por muito tempo, a descoberta de materiais duráveis para utilização diária, como os materiais plásticos, por exemplo, foi de extrema importância. Os materiais plásticos tornaram-se parte integrante da vida contemporânea em função de propriedades desejáveis, incluindo a durabilidade e versatilidade. Os plásticos à base de petróleo tornaram-se materiais valiosos, visto sua vasta gama de aplicações. No entanto, devido à sua baixa biodegradabilidade e acúmulo no ambiente, são considerados um dos principais poluentes ambientais. Os plásticos mais utilizados na vida diária são polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), politereftalato de etileno (PET) e policloreto de vinila (PVC) que, apesar do avanço no processamento e fabricação, geram dois grandes problemas: o uso de fonte não renovável, como matéria-prima e a grande quantidade de resíduos gerada para descarte (FRANCHETTI, MARCONATO, 2006; LEE, 1996; URTUVIA *et al.*, 2014).

Há uma crescente preocupação sobre os efeitos nocivos dos materiais plásticos de origem petroquímica no ambiente. Isso levou muitos países a dar início ao desenvolvimento de plásticos biodegradáveis (REDDY *et al.*, 2003). Os plásticos biodegradáveis são polímeros que podem ser completamente degradados, sob condições apropriadas do meio ambiente (SQUIO, ARAGÃO, 2004). Entre os vários polímeros biodegradáveis já descobertos, destaca-se o grupo dos biopolímeros conhecidos como Poli-hidroxicanoatos (PHAs), que são os poliésteres de vários monômeros hidroxicanoato (SHRIVASTAV *et al.*, 2013) sintetizados a partir de uma variedade de substratos, sendo armazenados como grânulos intracelulares de reserva de energia (URTUVIA *et al.*, 2014).

O Poli(3-hidroxiбутирато) (P(3HB)) é um polímero linear semicristalino que pertence à família dos PHAs (WELLEN *et al.*, 2013) que possui propriedades estruturais semelhantes às do polipropileno, com a vantagem de ser biodegradável, biocompatível e poder ser produzido a partir de fontes de carbono renováveis (RAVEENDRAN *et al.*, 2013). Porém, apesar da ampla faixa de aplicações e das características relevantes do P(3HB), seu elevado custo de produção em relação aos plásticos petroquímicos limita sua utilização. Sendo assim, há a necessidade de redução dos custos de produção dos PHAs e que suas características sejam semelhantes e/ou superiores às apresentadas pelos plásticos convencionais. Pode-se também considerar que suas aplicações possam estar vinculadas a produtos de alto valor agregado, como o uso em

aplicações médicas, por exemplo, para se tornarem comercialmente competitivos com os plásticos petroquímicos (PENLOGLOU *et al.*, 2010).

Há pesquisas em andamento em todo o mundo para o desenvolvimento de uma tecnologia eficaz para a produção de P(3HB), do ponto de vista econômico. Entre elas está a utilização de subprodutos agroindustriais como fonte de carbono, com o potencial de reduzir o custo de produção (PRABISHA *et al.*, 2015), pois cerca de 25 – 45% do custo total de produção pode ser atribuído à fonte de carbono (NARANJO *et al.*, 2013). Nesse contexto, o glicerol, um subproduto da produção de biocombustíveis que representa aproximadamente 10 e 6% (w/w) das produções de diéster e álcool, respectivamente é uma fonte de carbono de baixo custo (BARBIRATO *et al.*, 1998).

O tipo da fonte de carbono não somente afeta o rendimento e composição monomérica do polímero, como suas propriedades físico-químicas e mecânicas (APATI, 2012). Dependendo da aplicação, o biopolímero requer diferentes propriedades do material. (SHINDU *et al.*, 2013). Para identificação e caracterização de polímeros de origem biológica e sintética, são utilizadas técnicas de análise térmica como termogravimetria (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC), além de análises de cristalinidade, polarimetria, temperatura de fusão e dados cinéticos (WELLEN *et al.*, 2013; SHARMA, BAJAJ, 2015).

Uma ampla variedade de bactérias tem sido identificadas como produtoras de PHA ao longo das duas últimas décadas, incluindo *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida*, *Aeromonas hydrophila*, *Cupriavidus necator*, e muitos outros (WONG *et al.*, 2012). Porém, para a produção de P(3HB), *C. necator* é predominantemente investigada, podendo armazenar PHA até 96 % da sua massa seca de células sob condições de limitação de nitrogênio ou fosfato e excesso de fonte de carbono (RODRÍGUEZ-CONTRERAS *et al.*, 2015).

Entretanto, quando se utiliza glicerol como substrato, a produtividade e o rendimento de P(3HB) são significativamente menores em comparação a glicose (CAVALHEIRO *et al.*, 2009), sendo reportadas limitações no consumo de glicerol por *C. necator* DSM 545 (TANADCHANGSAENG, YU, 2012). Tendo isso em vista, Zanfonato (2016) realizou a construção de uma cepa recombinante de *C. necator* DSM 545, através da inserção dos genes responsáveis pelo consumo de glicerol de *Escherichia coli* (*glpKF*), para obter uma cepa com capacidade de assimilar de forma mais eficiente o glicerol.

No presente trabalho, o P(3HB) produzido pela bactéria *C. necator\_glpFK*, desenvolvida por Zanfonato (2016), utilizando glicerol ou glicerol e glicose associados como substratos, foi extraído e caracterizado quanto suas propriedades físico-químicas e térmicas.

## 1.1 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar o P(3HB) produzido por *C. necator\_glpFK*, a partir de glicerol e glicerol e glicose associados como substrato.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a influência da utilização do glicerol como substrato para a bactéria *C. necator\_glpFK* na massa molar do P(3HB) produzido;
- Caracterizar o P(3HB) produzido quanto às propriedades químicas, físicas, morfológicas e térmicas;
- Comparar o rendimento, porcentagem de recuperação, pureza, massa molar, concentração e estabilidade térmica dos biopolímeros produzidos com o biopolímero comercial;
- Analisar a influência de dois substratos (glicerol e glicose) nas características dos biopolímeros produzidos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo aborda características do P(3HB) produzido por bactérias, suas aplicações e métodos de extração. Os aspectos gerais da produção de PHAs, com ênfase na biossíntese de P(3HB) por *C. necator* com a utilização de glicerol e de glicose como substratos, também são abordados.

### 2.1 POLI-HIDROXIALCANOATOS (PHAs)

Os PHAs são um grupo de poliésteres bacterianos de vários monômeros hidroxialcanoatos, formados por carbono, oxigênio e hidrogênio, cuja fórmula estrutural está representada na Figura 1 (adaptado de LEE, 1996). A composição da cadeia lateral (R) e o valor de  $n$  determinam a identidade da unidade monomérica. Cerca de 150 diferentes unidades monoméricas já foram identificadas como constituintes dos PHAs em várias bactérias. (SHRIVASTAV *et al.*, 2013; LEE, 1996).

Eles podem ser sintetizados por numerosos microrganismos, existindo pelo menos 75 gêneros diferentes de bactérias. Esses polímeros são acumulados como compostos de armazenamento de energia intracelular, o qual pode ocorrer de duas formas: a primeira é quando estas requerem condição de limitação de um ou mais fatores ambientais ou nutricionais, tais como nitrogênio, fósforo, potássio, ou oxigênio, com fornecimento em excesso de fonte de carbono; e a segunda forma é quando o acúmulo de polímero ocorre durante crescimento celular, sem limitação de nutrientes. O acúmulo destes polímeros pode chegar a 90% do peso seco da célula. Os PHAs podem ter composição diferente dependendo do microrganismo, a fonte de carbono e as condições de cultura empregadas (MADISON, HUISMAN, 1999; KULKARNI *et al.*, 2010; REDDY *et al.*, 2003; URTUVIA *et al.*, 2014).

Os PHAs são divididos em dois grupos, dependendo do número de átomos de carbono nas unidades monoméricas. PHAs constituídos por unidades de ácidos hidroxialcanóicos de cadeia curta “*short-chain length*” (PHA<sub>SCL</sub>), que apresentam de 3 a 5 átomos de carbono; e PHAs constituídos por unidades de cadeia média “*medium-chain length*” (PHA<sub>MCL</sub>), que consistem de 6 a 14 átomos de carbono na cadeia. PHA<sub>SCL</sub> são termoplásticos rígidos, quebradiços e com um elevado grau de cristalinidade, enquanto os PHA<sub>MCL</sub> são materiais

**Figura 1** – Estrutura geral dos PHAs.

n	R	Polímero	
1	- H	Poli(3-hidroxiopropionato)	P(3HP)
	- CH <sub>3</sub>	Poli(3-hidroxiбутирато)	P(3HB)
	- CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	Poli(3-hidroxiуалерато)	P(3HV)
	- (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	Poli(3-hidroxiгексаноато)	P(3HHx)
	- (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>3</sub>	Poli(3-hidroxiоктаноато)	P(3HO)
	- (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CH <sub>3</sub>	Poli(3-hidroxiдеcanoато)	P(3HD)
	- (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> -CH <sub>3</sub>	Poli(3-hidroxiдодеcanoато)	P(3HDd)
	- CH <sub>2</sub>	Poli(3-hidroxi-5-фенилуалерато)	P(3HPV)
2	- H	Poli(4-hidroxiбутирато)	P(4HB)
	- CH <sub>3</sub>	Poli(4-hidroxiуалерато)	P(4HV)
3	- H	Poli(5-hidroxiбутирато)	P(5HB)
	- CH <sub>3</sub>	Poli(5-hidroxiуалерато)	P(5HV)

Fonte: Adaptado de LEE (1996).

elásticos, flexíveis, possuindo resistência à tração e baixo grau de cristalinidade. São exemplos de PHA<sub>SCL</sub>: P(3HB), poli(4-hidroxiбутирато) (P(4HB)) e poli(3-hidroxiуалерато) (P(3HV)), ou o copolímero poli(3-hidroxiбутирато-*co*-3-hidroxiуалерато) (P(3HB-*co*-3HV)), sendo o P(3HB) o mais atrativo. Exemplos de PHA<sub>MCL</sub>: homopolímeros de poli(3-hidroxi-гексаноато) (P(3HHx)), poli(3-hidroxiоктаноато) (P(3HO)) e copolímeros tais como poli(3-hidroxi-гексаноато-*co*-3-hidroxiоктаноато) (P(3HHx-*co*-3HO)). (OSMAN, *et al.*, 2016; SHRIVASTAV *et al.*, 2013; URTUVIA *et al.*, 2014; ANJUM *et al.*, 2016).

## 2.2 POLI(3-HIDROXIБУТИРАТО) (P(3HB))

O P(3HB) foi o primeiro PHA a ser identificado em 1926 por Maurice Lemoigne na bactéria *Bacillus megaterium* (LEMOIGNE, 1926 *apud* URTUVIA *et al.*, 2014). É um homopolímero que contém unidades de monômeros de 3-hidroxiбутирато (KULKARNI *et al.*, 2010). É também um polímero semicristalino totalmente biodegradável e biocompatível, além de uma alternativa para substituir plásticos convencionais derivados do petróleo (PRABISHA *et al.*, 2015; WELLEN *et al.*, 2013). Possui propriedades estruturais semelhantes às do

polipropileno, como a temperatura de fusão, massa molar, resistência à tração, com a vantagem de ser biodegradável, biocompatível e poder ser produzido a partir de fontes de carbono renováveis (RAVEENDRAN *et al.*, 2013).

### 2.2.1 Produção de P(3HB)

Apesar de ter propriedades promissoras, e da ampla faixa de aplicações, uma das principais limitações para a produção comercial de P(3HB) é o custo elevado de produção quando comparado com plásticos derivados do petróleo. Sendo assim, há a necessidade de redução desses custos e que as características do polímero produzido sejam semelhantes e/ou superiores às apresentadas pelos plásticos convencionais ou que suas aplicações possam estar vinculadas a produtos de alto valor agregado, para se tornarem comercialmente competitivos com os plásticos petroquímicos (WELLEN *et al.*, 2013; PRABISHA *et al.*, 2015; PENLOGLOU *et al.*, 2010).

Naranjo *et al.* (2013) reportaram que 25 – 45% do custo total de produção pode ser atribuído à matéria prima. Como a fonte de carbono é uma parte importante da matéria prima, há relatos sobre a utilização de subprodutos agroindustriais como única fonte de carbono, o que pode reduzir o custo total de produção. Subprodutos, tais como o glicerol bruto, efluentes de fábrica de azeite, efluentes de laticínios, resíduos de óleo de cozinha foram relatados para a produção do P(3HB) (PRABISHA *et al.*, 2015). Nesse contexto, o glicerol, proveniente da produção de biodiesel, é uma possível fonte de carbono de baixo custo para a síntese de P(3HB) (HAND *et al.*, 2016).

O glicerol, 1,2,3-propanotriol de acordo com a nomenclatura IUPAC, contém três grupos hidroxila, que são responsáveis pelo seu caráter higroscópico e solubilidade em água. Ele é um líquido viscoso incolor, inodoro, solúvel em diferentes líquidos polares e insolúvel em álcoois superiores, hidrocarbonetos e solventes clorados (HEJNA *et al.*, 2016).

O biodiesel é um biocombustível que tem sido cada vez mais procurado como uma alternativa aos combustíveis derivados do petróleo tradicionais, porque é renovável e neutro em carbono. Durante a produção de biodiesel, glicerol bruto é produzido na proporção de 1 kg de glicerol bruto por 10 kg de biodiesel, e representa aproximadamente 10 e 6% (w/w) das produções de diéster e álcool, respectivamente (HAND *et al.*, 2016; BARBIRATO *et al.*, 1998).

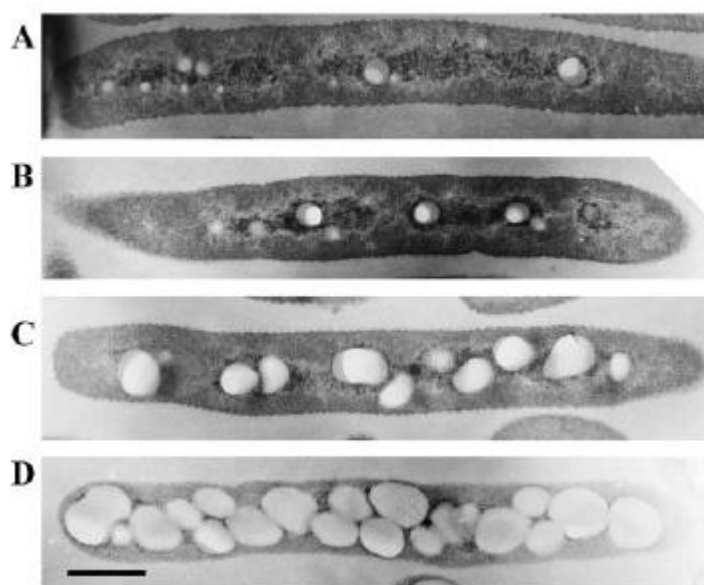


Para reduzir os custos de produção de biodiesel, há um interesse significativo na utilização de glicerol bruto como matéria-prima para gerar produtos de valor agregado, incluindo o P(3HB) (HAND *et al.*, 2016). Apesar de ser uma fonte de carbono de baixo custo, de acordo com a caracterização de Cavalheiro *et al.* (2009), quando glicerol é usado como substrato para síntese de P(3HB) por *C. necator*, uma baixa massa molecular é obtida, massa molecular ponderal média (Mw) na ordem de  $10^5$  Da, enquanto que, segundo os autores, algo em torno de  $10^6$  Da é obtido quando glicose, frutose ou sacarose são usados como fonte de carbono no cultivo.

Vários fatores podem ser considerados na seleção do microrganismo para a produção de PHAs, tais como a capacidade da célula para utilizar uma fonte de carbono de baixo custo, velocidade de crescimento, velocidade de síntese de polímero e o acúmulo de polímero de uma célula em particular. Dentre as bactérias utilizadas na síntese de PHAs, a maioria requer condição de limitação de um ou mais nutrientes, sendo *C. necator* a mais estudada. E dentre as bactérias que não necessitam de limitação está a *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* e *Escherichia coli* recombinante (OJUMU *et al.*, 2004; QUINES, 2015; FARIAS, 2009).

Tian *et al.* (2005) realizaram estudos da formação de grânulos de P(3HB) em *C. necator* por microscopia de transmissão eletrônica. Na Figura 2 é possível observar que, à medida que o cultivo celular ocorreu, os grânulos de P(3HB) apareceram e aumentaram gradualmente de tamanho até que praticamente a célula inteira ficou preenchida com os grânulos.

**Figura 2** – Imagens de microscopia de transmissão eletrônica de P(3HB) em *C. necator* selvagem nos tempos de 2,5 h (A), 5 h (B), 9 h (C), e 24 h (D). Tamanho da barra: 0,5  $\mu$ m.



Fonte: TIAN *et al.*, 2005.

## 2.3 PROPRIEDADES DO P(3HB)

Estudos sobre as propriedades térmicas e físicas dos polímeros bacterianos têm sido realizados, principalmente com o P(3HB) e seu copolímero Poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (P(3HB-co-3HV)) (XAVIER *et al.*, 2015; PHILIP *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2017). Como o P(3HB) é um polímero semicristalino, as suas propriedades são fortemente dependentes do tipo de substrato e das condições de produção, sendo que alterações no processo afetam tanto as propriedades físico-químicas e mecânicas do polímero produzido, quanto seu rendimento e composição monomérica (WELLEN *et al.*, 2013; GUMEL *et al.*, 2012 *apud* APATI, 2012).

O P(3HB) apresenta 100% de estereo especificidade, com todos os átomos de carbono assimétricos na configuração D (-), sendo, portanto, altamente cristalino. Sua cristalinidade varia de 55 a 80% e é relativamente rígido (LEE, 1996). Ele apresenta várias propriedades úteis para uso em embalagens, tais como resistência à umidade, insolubilidade em água e pureza óptica, além de boa impermeabilidade ao oxigênio, isto o diferencia de outros plásticos biodegradáveis disponíveis atualmente que são ou solúveis em água ou sensíveis à umidade (OJUMU *et al.*, 2004).

O P(3HB) é um termoplástico, ou seja, é uma resina que se torna altamente viscosa e moldável em temperaturas perto ou acima da temperatura de fusão. (CALVÃO, 2009). Suas propriedades físicas e mecânicas são comparáveis às do PP, como pode ser observado na Tabela 1.

**Tabela 1** – Comparação entre as propriedades do P(3HB) comercial e do PP.

<b>Características</b>	<b>P(3HB)</b>	<b>PP</b>
Temperatura de fusão	175 a 180	170 a 176
Temperatura de transição vítrea (T <sub>g</sub> ) (°C)	-5 a 5	-17 a -10
Grau de cristalinidade (%)	70 a 80	60 a 70
Módulo de elasticidade (Módulo de Young) (GPa)	3,5 a 4	1,7 a 2,8
Resistência à tração (MPa)	30 a 40	34,5 a 38
Resistência à ruptura (%)	5 a 45	60 a 400
Massa molar (g.mol <sup>-1</sup> )	5 x 10 <sup>4</sup> a 1 x 10 <sup>6</sup>	2 a 7 x 10 <sup>5</sup>
Permeabilidade de oxigênio (cm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> /atm/dia)	45	1700
Resistência à Ultra Violeta (UV)	Boa	Baixa
Resistência ao solvente	Baixa	Boa

Fonte: LEE, 1996; REDDY *et al.*, 2003; BASTIOLI, 2005; QUINES, 2015.

O ponto de fusão (175 a 180 °C) é ligeiramente menor do que a temperatura de degradação (185 °C) (OJUMU *et al.*, 2004), o que torna o processamento de moldagem por injeção difícil. Apesar de tanto o P(3HB) quanto o PP apresentarem alto grau de cristalinidade e fundirem a temperaturas próximas, os valores de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) são diferentes, indicando que o PP é mais flexível que o P(3HB).  $T_g$  é a temperatura na qual os polímeros passam do estado vítreo para o estado borrachoso, adquirindo certo grau de flexibilidade devido à maior movimentação entre as cadeias macromoleculares, portanto quanto menor a  $T_g$ , mais flexível é o polímero. Essa diferença de flexibilidade é confirmada pelo módulo de elasticidade, que está diretamente relacionado com a sua rigidez ou flexibilidade de forma que, quanto mais alto o módulo, maior a rigidez do polímero, sendo os valores para o PP menores que para o P(3HB). Além disso, a resistência à ruptura de P(3HB) (5 a 8 %) é significativamente mais baixa do que a de PP (400 %) (FORMOLO *et al.*, 2003; APATI, 2012; OJUMU *et al.*, 2004).

P(3HB) é instável durante o processamento a temperaturas elevadas (maiores do que o ponto de fusão) e / ou em períodos de tempo prolongados, causando a degradação térmica que reduz o seu desempenho mecânico (WELLEN *et al.*, 2013). Por ser um produto de síntese microbiana, o P(3HB) é um polímero biodegradável, que lançado no ambiente sofre ação de microrganismos e é degradado em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Durante a degradação, em temperaturas próximas a sua temperatura de fusão, ocorre a quebra das ligações ésteres entre as unidades repetitivas e a rápida redução de sua massa molar média. Como há a diminuição da massa molar do P(3HB) durante a degradação térmica, todas as propriedades físicas e mecânicas são alteradas também. Além da degradação se dar em temperaturas próximas à temperatura de fusão, a alta cristalinidade, rigidez e o fato de ser quebradiço reduz sua aplicação, porém a adição de agentes nucleantes, plastificantes ou outros aditivos tem sido utilizados para conferir novas aplicações ao P(3HB) (APATI, 2012; QUINES, 2015).

#### 2.4 EXTRAÇÃO DE P(3HB)

A última fase da produção de P(3HB) envolve a sua extração das células, pois se trata de um produto acumulado intracelularmente. Esta etapa geralmente é de custo elevado, sendo um entrave para a utilização desses materiais (OJUMU *et al.*, 2004; QUINES, 2015; CORRÊA,

2014). Antes da extração, no fim do cultivo, as células contendo P(3HB) são separadas do meio de cultivo por métodos convencionais como centrifugação, filtração ou floculação (LEE, 1996).

O tratamento da biomassa após o cultivo é opcional e tem a finalidade de aumentar a recuperação polimérica por desestabilização e/ou rompimento da parede celular microbiana. É uma etapa de extrema importância, pois pode acarretar em alterações nas propriedades do produto final (QUINES *et al.*, 2015). Os métodos de extração envolvem processos químicos, físicos ou biológicos, ou combinação desses processos. Dentre os métodos químicos, destaca-se a utilização isolada ou combinada de solventes orgânicos e digestores químicos para a extração do P(3HB) da biomassa sendo clorofórmio, cloreto de metileno, carbonato de propileno e dicloroetano os solventes mais utilizados. Estes solventes rompem as células, solubilizando seus componentes, inclusive os PHAs. Compostos orgânicos polares, como acetonas e álcoois, também podem ser usados. Eles rompem o material celular não polimérico, deixando os grânulos de PHAs intactos (FIORESE, 2008; RAMSAY *et al.*, 1994; HAHN *et al.*, 1995; LEE, 1996).

Corrêa (2014) utilizou os seguintes solventes renováveis: acetato de etila – que no Brasil é fabricado a partir de etanol de cana de açúcar – e isômeros *n* e *iso* de butanol e pentanol. Em comparação com o clorofórmio e hipoclorito, também testados por Corrêa, os solventes alcoólicos apresentaram pouca solubilidade do P(3HB) e o acetato de etila apresentou resultados da mesma ordem dos obtidos com clorofórmio, com a vantagem que é de origem renovável e tem menor custo.

## 2.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE POLÍMEROS

Dependendo de suas características, os biopolímeros podem ser empregados em diversas áreas como, por exemplo, na indústria farmacêutica e na de alimentos. Podem ser caracterizados pelas suas propriedades mecânicas, grau de cristalinidade, temperatura de transição vítrea, temperatura de degradação, distribuição da massa molar, entre outras. A determinação destas características é de grande importância, pois influenciam diretamente nas aplicações dos biopolímeros (DUARTE *et al.*, 2004 *apud* DALCANTON, 2006).

As propriedades físicas, mecânicas e termodinâmicas dos polímeros são dependentes do grau de cristalinidade e da morfologia das regiões cristalinas. A análise térmica diferencial (DTA) e a calorimetria diferencial de varredura, ou calorimetria exploratória diferencial (DSC),

são técnicas normalmente empregadas para a análise térmica de materiais. Para a caracterização de propriedades mecânicas como resistência à tração e elasticidade existem vários tipos de ensaios, porém grande parte dos ensaios mecânicos pode ser registrada por meio de curvas de tensão por deformação. No que se refere aos aspectos estruturais de composição química, estrutura configuracional e conformacional, a espectroscopia no infravermelho é uma das ferramentas de caracterização de materiais poliméricos mais utilizadas. Quanto às propriedades do polímero tais como resistência na ruptura, deformação na ruptura e resistência ao impacto, serão diretamente afetadas pela massa molar, que pode ser determinada pela cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) ou pela medida da viscosidade de soluções poliméricas (CANEVAROLO, 2006).

## 2.6 APLICAÇÕES DE P(3HB)

Inicialmente, PHAs foram usados para fazer artigos diários tais como frascos de xampu e materiais de embalagens (PHILIP *et al.*, 2007). Bucci (2003), em seu estudo concluiu através de testes físicos, dimensionais, mecânicos e sensoriais que o P(3HB) pode substituir o PP ou outros polímeros sintéticos em embalagens para acondicionamento de alimentos como margarina, maionese e requeijão, inclusive para uso em freezer e micro-ondas.

Quanto às aplicações médicas, de acordo com Lee (1996), o produto de degradação do P(3HB), o monômero D(-) 3-hidroxi butirato foi detectado em quantidade relativamente grande de plasma de sangue humano. Sendo assim, é altamente plausível que a implantação de P(3HB) em tecidos de mamíferos não seja tóxico. (OJUMU *et al.*, 2004). Alves *et al.* (2011) estudaram uma composição de 70% de PHB e 30% de hidroxiapatita (HA) para implante ortopédico em gatos, sugerindo que essa combinação de compostos deve ser mais estudada antes de ser usado como um implante ortopédico em animais.

O P(3HB) ou os seus copolímeros podem ser usados para fazer a cobertura de Tecido não Tecido (TNT) e filme plástico com barreiras contra a umidade em fraldas e toalhas sanitárias, juntamente com algumas aplicações de filmes paramédicos em hospitais (PHILIP *et al.*, 2007). Xavier *et al.* (2015) avaliaram filmes de P(3HB), produzido por *Bacillus mycoides*, contendo vanilina quanto à atividade antimicrobiana contra patógenos transmitidos por alimentos e bactérias de deterioração, sob a forma de invólucro biodegradável, com o objetivo melhorar a vida útil dos alimentos. Foi concluído que os filmes antimicrobianos incorporados à vanilina

são promissores e possuem potenciais aplicações alimentares, porém são necessários mais estudos para apoiar o encapsulamento da vanilina para liberação controlada, e a aplicação de filmes antimicrobianos em produtos alimentares.

Biomer, uma empresa alemã, possui a tecnologia para produzir P(3HB) a partir de *Alcaligenes latus* em larga escala. O polímero produzido é utilizado para fazer objetos como pentes, canetas e marcadores. Os polímeros derretidos têm baixa viscosidade, permitindo a moldagem por injeção de objetos com paredes finas. O produto final é muito duro e pode ser usado a temperaturas de -30 a 120 °C. Este produto degrada-se no prazo de dois meses, no ambiente (PHILIP *et al.* 2007).

Outras empresas já produzem PHB industrialmente, como a Sigma Aldrich, que produz P(3HB) puro; PHB Industrial SA, que atua na fabricação de resinas termoplásticas, e é proprietária da marca BIOCYCLE®; NaturePlast, localizada na França, fundadora da Biopolynov, centro dedicado à modificação e à melhoria das propriedades dos bioplásticos; A Metabolix, empresa com sede nos EUA, comercializa agora, entre outros, o Metabolix PHA, que é uma mistura de P(3HB) e poli(3-hidroxoctanoato), um elastômero aprovado pela *Food and Drug Administration* – FDA para a produção de aditivos alimentares. Um resumo das possíveis aplicações industriais do biopolímero P(3HB) estão apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2** – Aplicações possíveis do P(3HB) por processo, indústria e produtos.

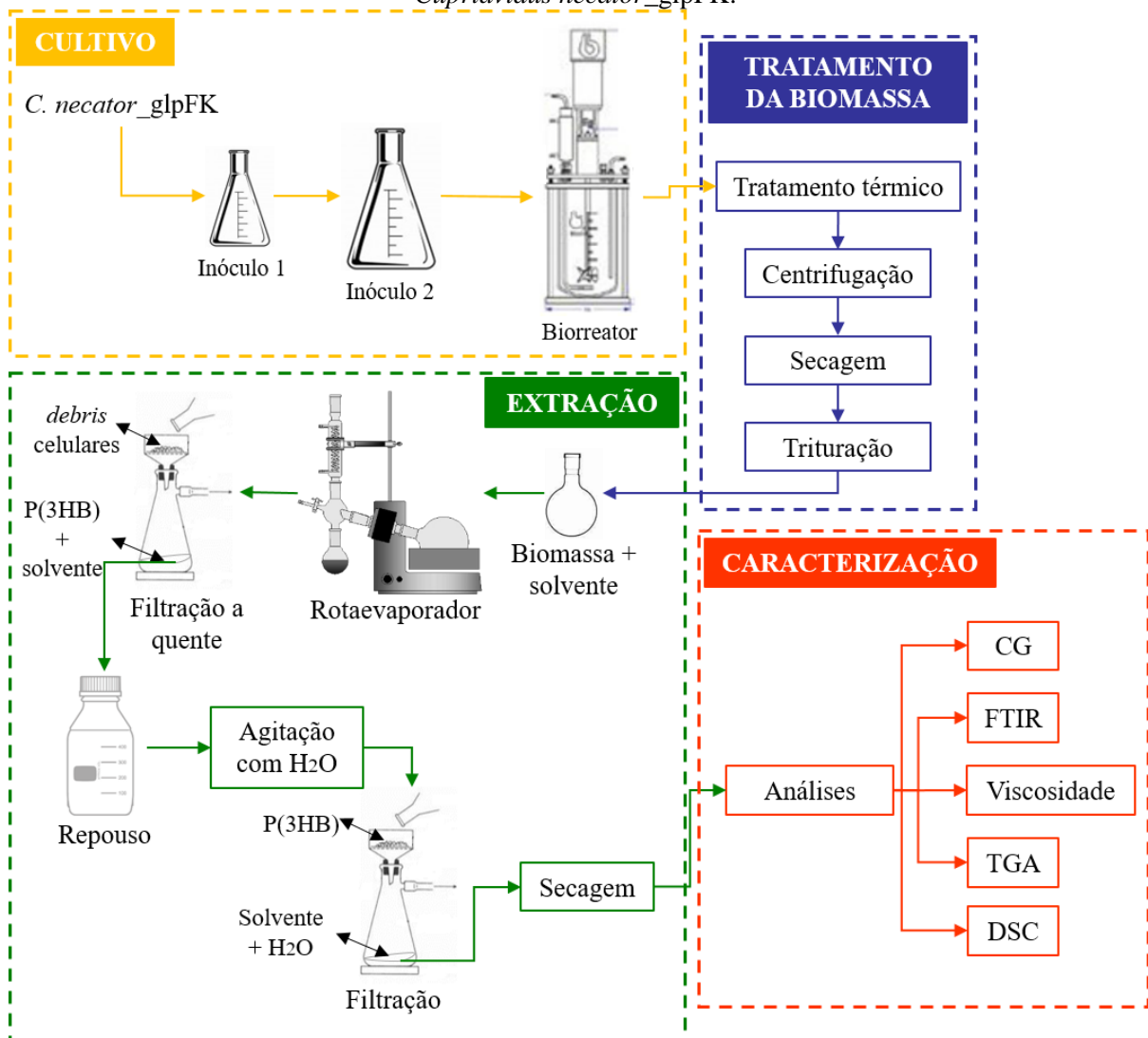
<b>APLICAÇÕES DO P(3HB)</b>			
<b>PROCESSOS</b>	<b>INDÚSTRIA</b>	<b>PRODUTOS</b>	
<b>Extrusão de Chapas</b>	Cartões/Informação	Telefones/Crédito/Débito	
	Embalagens		Berços Termoformados
			Bandejas Termoformadas
			Chapas separadoras
	Veterinária		DLH (dispositivo de liberação hormonal)
Agrícola		Marcadores (brincos de boi/local)	
<b>Injeção</b>	Higiene pessoal		Barbeadores
			Escovas de dentes
	Embalagens		Tampas de frascos
			Potes em geral
	Brinquedos		Diversos
			Canetas
			Lápis
	Réguas		
<b>Coating Paper</b>	Automobilística		Componentes injetados
	Embalagens		Cartonados

FONTE: PHB Industrial SA (2017).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Para realizar a extração e caracterização dos biopolímeros, são necessários algumas etapas prévias: etapa de cultivo, para produção dos mesmos e tratamento da biomassa, a qual é seguida da extração e caracterização. A Figura 3 mostra o fluxograma geral do processo de produção, extração e caracterização do P(3HB) por *Cupriavidus necator\_glpFK*. A seguir, cada etapa realizada experimentalmente está descrita nos itens abaixo.

**Figura 3** – Fluxograma geral das etapas de produção, extração e caracterização do P(3HB) por *Cupriavidus necator\_glpFK*.



### 3.1 BIOMASSA

As biomassas de *Cupriavidus necator\_glpFK* (ZANFONATO, 2016) contendo P(3HB) utilizadas para a extração foram obtidas a partir de dois cultivos diferentes: uma utilizando-se glicerol como substrato e outra utilizando glicerol e glicose associados como substrato, sendo o nitrogênio o nutriente limitante em ambos os cultivos.

O cultivo de *Cupriavidus necator\_glpFK* a partir de glicerol foi em batelada alimentada, na qual se iniciou com 20 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e após 27 h de cultivo, no qual havia 9 g.L<sup>-1</sup> de glicerol, foi dado um pulso de glicerol alterando a concentração do meio em 20 g.L<sup>-1</sup> de glicerol. Após 48 h de cultivo, obteve-se a concentração de 21 g.L<sup>-1</sup> de células e aproximadamente 11 g.L<sup>-1</sup> de biopolímero.

O cultivo de *Cupriavidus necator\_glpFK* a partir de glicerol e de glicose associados foi em batelada na qual se iniciou com 10 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose. Após 26 h de cultivo, obteve-se a concentração de 15 g.L<sup>-1</sup> de células e aproximadamente 10 g.L<sup>-1</sup> de biopolímero.

Após cada cultivo, foram realizados os processos de tratamento térmico, centrifugação, secagem e trituração, antes da extração com solvente.

#### 3.1.1 Tratamento da biomassa

A suspensão de biomassa, obtida de ambos os cultivos, foi submetida à temperatura de 95 °C durante 45 min com agitação, para inativar a enzima PHA depolimerase, responsável pela degradação do biopolímero, e desnaturar as proteínas da membrana e, conseqüentemente, desestabilizar a parede celular e facilitar a ação do solvente na solubilização do P(3HB) intracelular (KAPRITCHKOFF *et al.*, 2000).

Após o tratamento térmico, a suspensão foi centrifugada a 2000 g por 15 min a 20 °C, na centrífuga de modelo 5804 R (Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com água destilada, misturado em vórtex e centrifugado novamente, nas mesmas condições anteriores.



O segundo sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado contendo P(3HB) foi disposto em placas de Petri e em estufa a 65 °C por 24 h, para secagem. As células contendo P(3HB) foram raspadas das placas de Petri e trituradas utilizando um *mixer* de mão (NKS, modelo TSK 560), e armazenadas à temperatura ambiente para posterior extração.

### 3.3 EXTRAÇÃO DE P(3HB) COM CARBONATO DE PROPILENO

Para a extração do biopolímero, o carbonato de propileno foi aplicado com a finalidade de permear na membrana celular da bactéria com biopolímero acumulado, solubilizar e recuperar o P(3HB), de acordo com a metodologia proposta por Quines (2015). A extração do biopolímero, através do método seguido, utiliza 0,15 g células secas para cada 1 mL de carbonato de propileno aquecido a 150 °C. Segundo o referido autor, o carbonato de propileno pode ser recuperado e reutilizado até 11 vezes sem perder sua efetividade. O solvente empregado no presente trabalho foi o carbonato de propileno já utilizado uma vez em extração anterior e recuperado em rotaevaporador (IKA, modelo RV 10 *basic*).

As extrações foram realizadas em rotaevaporador (IKA, modelo RV 10 *basic*), sob agitação constante de 120 rpm no qual 4,5 g de células secas contendo P(3HB), previamente trituradas, foram suspensas em 30 mL de solvente e aquecido a 150 °C, por 45 min. Após o tempo de extração, a suspensão continha carbonato de propileno recuperado, *debris* celulares e P(3HB), e foi filtrada à quente (100 °C) sob vácuo para separar os *debris* celulares, sólidos, da solução de solvente com P(3HB). Os equipamentos utilizados foram compostos por kitassato, funil de porcelana, filtro de papel qualitativo com poro de 14 µm e diâmetro de 12,5 cm (Qualy®) e bomba a vácuo J. B. Industries – DV 200N 250.

Os *debris* celulares, retidos no filtro, foram lavados com 60 mL de carbonato de propileno recuperado aquecido a 150 °C, e depois descartados junto com o filtro. O permeado, solução de solvente com o biopolímero, permaneceu em repouso por 30 min à temperatura ambiente. Após o repouso, foi feita adição de água na proporção 4:1 (água:solvente), considerando o volume de solvente empregado na extração e para lavagem após a primeira filtração, com a finalidade de precipitar o P(3HB).

A suspensão de água, carbonato de propileno e P(3HB) foi submetida à agitação constante por 30 min, e submetida à outra filtração, no mesmo aparato que a filtração anterior, porém à temperatura ambiente. O biopolímero, retido no filtro, foi lavado com 200 mL de água destilada

e este filtro foi disposto em estufa a 65 °C por 24 h, para secagem do P(3HB) extraído. O filtrado, que é uma solução de solvente e água, pode ser submetida à temperatura de 80 °C no rotaevaporador (IKA, modelo RV 10 *basic*), sob agitação constante de 120 rpm e utilizando bomba de vácuo para evaporação da água e recuperação do carbonato de propileno.

### 3.4 DETERMINAÇÃO DE P(3HB)

A concentração de P(3HB) nas amostras de polímero extraído dos dois cultivos foi determinada por cromatografia gasosa, conforme o método de metanólise descrito por Brandl *et al.* (1988), no qual fez-se reagir cada amostra de biopolímero, aproximadamente 15 mg, em tubo de ensaio com tampa de rosca contendo 2 ml de clorofórmio e 2 mL de metanol acidificado (15% de ácido sulfúrico), durante 140 min a 100 °C.

Os tubos de ensaio contendo as amostras e a solução descrita acima foram fechados, agitados em vórtex e colocados em banho a 100 °C, durante 1 h. Decorrido este tempo, os tubos foram agitados em vórtex, e recolocados no banho por mais 1 h e 20 min. Enfim, as amostras foram retiradas do banho e submetidas a um banho de gelo para interromper a reação. Em seguida, adicionou-se 1 mL de água destilada, sendo a mistura agitada em vórtex por 30 s para formação de duas fases. Com uma pipeta *Pasteur*, a fase orgânica (inferior) (clorofórmio + P(3HB)) foi retirada e armazenada em micro tubos de plástico para posterior análise em cromatografia gasosa.

Para a elaboração da curva padrão de P(3HB), o polímero puro P(3HB) da Sigma-Aldrich foi pesado de forma a se obter dez valores de massa entre 0,002 e 0,0286 g, e submetido à metanólise.

A determinação quantitativa de P(3HB) foi realizada por cromatografia gasosa em uma coluna capilar com sílica fundida Rtx®-Wax (Crossbond® polyethylene glycol – 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As amostras metanolizadas foram injetadas (1 µL) no cromatógrafo SHIMADZU GC-14B equipado com detector de ionização de chama (FID ar-hidrogênio), utilizando nitrogênio como gás de arraste. As condições de operação utilizadas foram: vazão do gás de arraste de 40 mL min<sup>-1</sup>, temperatura do injetor de 250 °C, temperatura da coluna de 60 a 141 °C e temperatura do detector de 300 °C.

Para a determinação da pureza do P(3HB) extraído (%), utilizou-se a Equação 1 (QUINES, 2015):

$$\text{pureza} = \frac{m_{\text{P(3HB)}}}{m_{\text{T}}} \times 100 \quad (1)$$

Em que:

$m_{\text{P(3HB)}}$  = massa de biopolímero detectada por cromatografia (g)

$m_{\text{T}}$  = massa do material extraído utilizado para a análise cromatográfica (g).

A partir da pureza do P(3HB) extraído, foi possível determinar a recuperação de polímero extraído em % por meio das equações 2 e 3 (QUINES, 2015):

$$\text{recuperação} = \frac{m_{\text{p}}}{m_{\text{i}}} \times 100 \quad (2)$$

$$m_{\text{p}} = m_{\text{f}} \times \text{pureza} \quad (3)$$

Em que:

$m_{\text{p}}$  = massa de P(3HB) puro (g)

$m_{\text{f}}$  = massa de P(3HB) obtida após a extração (g).

$m_{\text{i}}$  = massa total de P(3HB) nas células antes da extração (g), determinado por CG.

### 3.5 CARACTERIZAÇÃO DE P(3HB)

O biopolímero extraído no presente trabalho foi caracterizado quanto à massa molar, temperatura de fusão, temperatura de cristalização, temperatura de transição vítrea, cristalização, oxidação, decomposição através das seguintes análises: espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), viscosidade, análise termogravimétrica (TGA), calorimetria diferencial de varredura ou calorimetria exploratória diferencial (DSC).

### 3.5.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi um importante método para a identificação dos biopolímeros produzidos, realizada pela caracterização dos grupamentos funcionais dos biopolímeros extraídos. O equipamento utilizado foi Cary 600 Series FTIR Spectrometer – AGILENT TECHNOLOGIES (Central de Análises do EQA – UFSC), no intervalo de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , pela técnica de refletância difusa.

### 3.5.2 Viscosidade

A análise de viscosidade de soluções dos P(3HB)'s extraídos neste trabalho foram realizadas para determinar a massa molar média de cada polímero, os quais foram solubilizados utilizando clorofórmio como solvente. Os ensaios foram realizados tanto nos dois biopolímeros extraídos neste trabalho quanto no polímero comercial da PHB Industrial SA, para haver a comparação dos valores.

O preparo das amostras ocorreu da seguinte forma: cerca de 0,5 g de cada polímero foi dissolvido em 100 mL de clorofórmio, utilizando balão volumétrico. A partir desta solução concentrada, 5 diluições foram preparadas seguindo a Tabela 3, sendo  $V_{\text{sol.conc.}}$  o volume de solução concentrada do balão volumétrico utilizada;  $V_{\text{solvente}}$  o volume de clorofórmio adicionado em cada diluição;  $V_{\text{final}}$  o volume final de cada diluição.

**Tabela 3** – Preparo das soluções poliméricas para medidas de viscosidade relativa.

Solução	$V_{\text{sol.conc.}}$ (mL)	$V_{\text{solvente}}$ (mL)	$V_{\text{final}}$ (mL)	Concentração de P(3HB) (c) ( $\text{g.mL}^{-1}$ )
1	1	9	10	$0,5 \times 10^{-3}$
2	2	8	10	$1,0 \times 10^{-3}$
3	4	6	10	$2,0 \times 10^{-3}$
4	6	4	10	$3,0 \times 10^{-3}$
5	8	2	10	$4,0 \times 10^{-3}$
6	9	1	10	$4,5 \times 10^{-3}$

Após o preparo das diluições, um viscosímetro capilar CANNON-FENSKE n° 150, foi acoplado em um sistema de viscosímetro modular Viscosystem® AVS 470 equipado com termostato SCHOTT CT 52. Esse equipamento foi utilizado para determinar o tempo requerido para o escoamento do solvente puro ( $t_0$ ) e o tempo requerido para que cada solução polimérica passe através do tubo capilar ( $t$ ). Cada medida foi repetida 5 vezes, de modo a se obter um valor médio do tempo de 5 medidas bem próximas.

É possível relacionar, para um determinado viscosímetro, a viscosidade como função apenas da densidade da solução e do tempo de escoamento da mesma no capilar, sendo que os demais fatores são constantes (REOLON, 2011). Como a viscosidade relativa é a relação entre a viscosidade das soluções poliméricas ( $\eta$ ) e a viscosidade do solvente puro ( $\eta_0$ ), para soluções muito diluídas, a densidade específica da solução ( $\rho$ ) é aproximadamente o valor da densidade específica do solvente puro ( $\rho_0$ ). Assim, é possível determinar as viscosidades listadas na Tabela 4 (adaptado de CANEVAROLO, 2006), as quais serão utilizadas no cálculo da massa molar média dos polímeros ( $\overline{M}_v$ ).

**Tabela 4** – Definições de viscosidades utilizadas.

Nome e símbolo	Definição matemática
Viscosidade relativa ( $\eta_{rel}$ )	$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t \cdot \rho}{t_0 \cdot \rho_0} \cong \frac{t}{t_0}$
Viscosidade específica ( $\eta_{sp}$ )	$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1$
Viscosidade reduzida ( $\eta_{red}$ )	$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c}$
Viscosidade intrínseca ( $\eta_i$ )	$\eta_i = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{red}$

FONTE: Adaptado de CANEVAROLO (2006).

A viscosidade intrínseca ( $\eta_i$ ) está relacionada com a massa molar média ( $\overline{M}_v$ ) pela Equação 4 (equação de Mark-Howink-Sakurada) (CANEVAROLO, 2006):

$$\eta_i = K(\overline{M}_v)^a \quad (4)$$

Em que:

K e a são constantes que dependem do polímero, solvente e temperatura.

Para P(3HB) em clorofórmio a 20 °C:  $K = 1,51 \times 10^{-2} \text{ mL.g}^{-1}$  e  $a = 0,756$  (AKHTAR *et al.*, 1991).

### 3.5.3 Análise termogravimétrica (TGA)

Análise termogravimétrica foi utilizada para avaliar a degradação térmica dos biopolímeros extraídos, sendo possível obter a temperatura de início de degradação ( $T_{\text{onset}}$ ), a temperatura máxima de degradação ( $T_{\text{peak}}$ ) e a porcentagem de perda de massa dos P(3HB)'s extraídos, ou pureza. A análise foi realizada em equipamento STA 449 F3 Jupiter – Netzsch (Laboratório de Controle de Processos – UFSC). As condições de processo para todas as amostras foram: razão de aquecimento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  em uma faixa de temperatura de 23 a  $790\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em atmosfera de nitrogênio.

### 3.5.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As medidas de DSC foram realizadas para caracterizar os biopolímeros quanto à temperatura de fusão ( $T_m$ ), temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) e grau de cristalinidade ( $X_c$ ). Amostras entre  $1$  e  $3 \pm 1$  mg foram fechadas em cápsulas de alumínio e analisadas em equipamento Jade-DSC – Perkin Elmer (Central de Análises do EQA – UFSC). Foram realizadas duas corridas de aquecimento e uma de resfriamento. O primeiro aquecimento foi de  $-30$  a  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com velocidade de aquecimento de  $40\text{ }^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ . Em seguida resfriou-se o sistema a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  e foi novamente aquecido com velocidade de aquecimento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ , de  $-30$  a  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As análises foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio de  $50\text{ mL.min}^{-1}$ .

O grau de cristalinidade ( $X_c$ ) do polímero foi determinada a partir da relação entre a entalpia de fusão da amostra ( $\Delta H_m$ ) e a entalpia de fusão de P(3HB) 100 % cristalino,  $142\text{ J.g}^{-1}$  (TSUJI, IKADA, 1996), sendo calculado a partir da Equação 5.

$$X_c = \frac{\Delta H_m - \Delta H_c}{\Delta H_m^0} \times 100 \quad (5)$$

Em que:

$\Delta H_m$  = entalpia de fusão da amostra ( $\text{J.g}^{-1}$ )

$\Delta H_c$  = entalpia de cristalização da amostra ( $\text{J.g}^{-1}$ )

$\Delta H_m^0$  = entalpia de fusão considerando o polímero 100 % cristalino ( $\text{J.g}^{-1}$ ).

Para P(3HB)  $\Delta H_m^0 = 142\text{ J.g}^{-1}$  (TSUJI, IKADA, 1996).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DETERMINAÇÃO DE P(3HB)

Os valores obtidos por cromatografia de massa de P(3HB) e os resultados de pureza e recuperação calculados pelas equações 1, 2 e 3, descritas no item 3.4, estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5** – Dados utilizados para a determinação de P(3HB) e resultados de recuperação e pureza de P(3HB) obtidos para as amostras dos biopolímeros extraídos de *C. necator\_glpFK* com os diferentes substratos: A = glicerol e B = glicerol e glicose.

Amostra	m <sub>T</sub> (mg)	m <sub>P(3HB)</sub> (mg)	m <sub>f</sub> (g)	m <sub>P</sub> (g)	m <sub>i</sub> (g)	Recuperação (%)	Pureza (%)
A <sub>1</sub>	14,10	13,40	2,15	2,05	2,39	86	95
A <sub>2</sub>	15,20	14,44	2,11	2,00	2,39	84	95
B <sub>1</sub>	15,70	14,92	2,44	2,31	3,15	73	95
B <sub>2</sub>	15,40	14,63	2,35	2,23	3,15	71	95

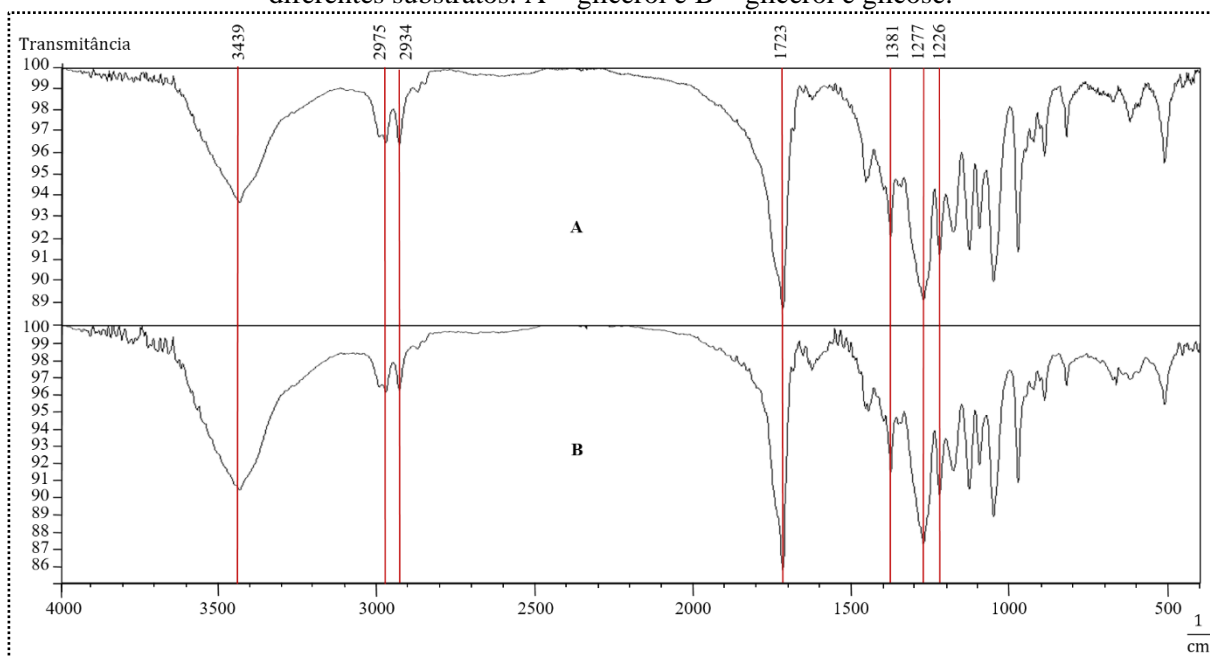
Os valores de pureza encontrados para os dois polímeros extraídos neste trabalho foram em torno de 95%, um pouco abaixo do valor de 99%, encontrado por Quines (2015). O referido autor atribuiu esse alto valor de pureza à alta solubilidade do P(3HB) no carbonato de propileno e à facilidade de separação do polímero do solvente, pela precipitação e lavagem do polímero com água destilada. Essa diferença de 4% de pureza encontrado no presente trabalho, pode ser em função da utilização de carbonato de propileno reutilizado na extração do P(3HB) neste estudo, embora Quines (2015) tenha afirmado que o solvente poderia ser reutilizado até 11 vezes.

Fiorese (2008) obteve pureza de 71,8 a 83,6% e recuperação de 63,2 a 95%, com diferentes métodos de extração realizados, porém todos com carbonato de propileno como solvente e acetona para lavagem do polímero. A biomassa utilizada pelo autor foi de *C. necator* a partir glicose como substrato, enquanto Quines (2015) usou biomassa cultivada em frutose e glicose como substratos. Portanto, como os valores encontrados no presente trabalho estão de acordo com a literatura para produção de P(3HB) com *C. necator* e extração com carbonato de propileno, o uso do glicerol como substrato tanto isolado quanto combinado com glicose não afetou os resultados de recuperação e pureza dos polímeros.

## 4.2 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

O estudo com a técnica de espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi importante para identificação dos biopolímeros produzidos por *C. necator\_glpFK* através da caracterização dos grupamentos funcionais dos mesmos. A Figura 4 apresenta os espectros de FTIR para os biopolímeros extraídos, em que os valores dos picos característicos das amostras estão destacados, e a comparação das principais bandas de absorção das amostras deste trabalho com os dados da literatura estão apresentadas na Tabela 6.

**Figura 4** – Espectro de FTIR para as amostras de P(3HB) extraídas de *C. necator\_glpFK* com os diferentes substratos: A = glicerol e B = glicerol e glicose.





**Tabela 6** – Bandas características no espectro de FTIR para os dois P(3HB)'s extraídos.

Faixa de absorção (cm <sup>-1</sup> )		Atribuição do grupo funcional	Referência
Amostras de P(3HB)	P(3HB) literatura		
1226 – 1277	1278	C-O-C	Maia, 2016
	1120–1280		Saratale, Oh, 2015
	1227 - 1287		Quines, 2015
	1050 - 1230		Rodríguez-Contreras <i>et al.</i> , 2015
	1053 - 1275		Sombrio, 2016
1381	1382 - 1458	CH <sub>3</sub>	Maia, 2016
	1379 - 1455		Saratale, Oh, 2015
	1385		Quines, 2015
	1370 - 1390		Rodríguez-Contreras <i>et al.</i> , 2015
	1379		Sombrio, 2016
1723	1720	C=O	Maia, 2016
	1721		Saratale, Oh, 2015
	1724		Quines, 2015
	1726		Rodríguez-Contreras <i>et al.</i> , 2015
	1719		Sombrio, 2016
2934 – 2975	2931 - 2972	C-H	Maia, 2016
	2910–3300		Saratale, Oh, 2015
	2937 - 2983		Quines, 2015
	2850 - 2960		Rodríguez-Contreras <i>et al.</i> , 2015
	2934 - 2976		Sombrio, 2016
3439	3437	OH	Maia, 2016
	3444		Saratale, Oh, 2015
	3940		Quines, 2015

As duas amostras apresentaram os mesmos picos e bandas, característicos do P(3HB): bandas em 1226 – 1277 cm<sup>-1</sup> e 2934 – 2975 cm<sup>-1</sup> correspondentes aos grupos C-O-C e CH, respectivamente; picos em 1381 e 1723 cm<sup>-1</sup> que equivalem aos grupos CH<sub>3</sub> e C=O, respectivamente.

Em ambos os espectros, houve o aparecimento de um pico em 3439 cm<sup>-1</sup>, também encontrado por Maia (2016), Saratale, Oh, (2015) e Quines (2015), com valores semelhantes (3437 – 3444), que foi atribuído ao estiramento OH, indicando a presença de umidade no material.

Compilando os resultados de Maia (2016), Saratale, Oh, (2015), Quines (2015), Rodríguez-Contreras *et al.* (2015), e Sombrio (2016), bandas em torno de 1050 e 1287  $\text{cm}^{-1}$  correspondem à vibração da molécula com deformação axial ou estiramento do grupo C-O-C, nos picos entre 1370 – 1458  $\text{cm}^{-1}$  há uma deformação angular simétrica que corresponde ao grupo  $\text{CH}_3$ . Bandas entre 1719 – 1726  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas a deformações axiais da carbonila C=O, e as deformações axiais simétrica e assimétrica da ligação C-H na cadeia de P(3HB) foram encontradas nas bandas de 2850 – 3300  $\text{cm}^{-1}$ .

Em suma, com a análise de FTIR, foi possível confirmar as amostras de polímero extraídas, com os diferentes tipos de substratos, como sendo o P(3HB) e concluir que o processo de extração deste a partir de cultivo de *C. necator\_glpFK*, com carbonato de propileno reutilizado, não causou alterações químicas drásticas em sua cadeia polimérica, pois os picos de absorção observados nos espectros estão de acordo com os reportados na literatura tanto para o espectro de P(3HB) puro quanto para o dos biopolímeros produzidos em cada referência.

### 4.3 VISCOSIDADE

Experimentos viscosimétricos mostram a existência de uma relação entre tamanho de partícula, ou tamanho molar, e a viscosidade de dispersões coloidais inorgânicas ou de soluções macromolares. Esta relação torna possível determinar a massa molar a partir da viscosidade de soluções macromolares diluídas (CANEVAROLO, 2006).

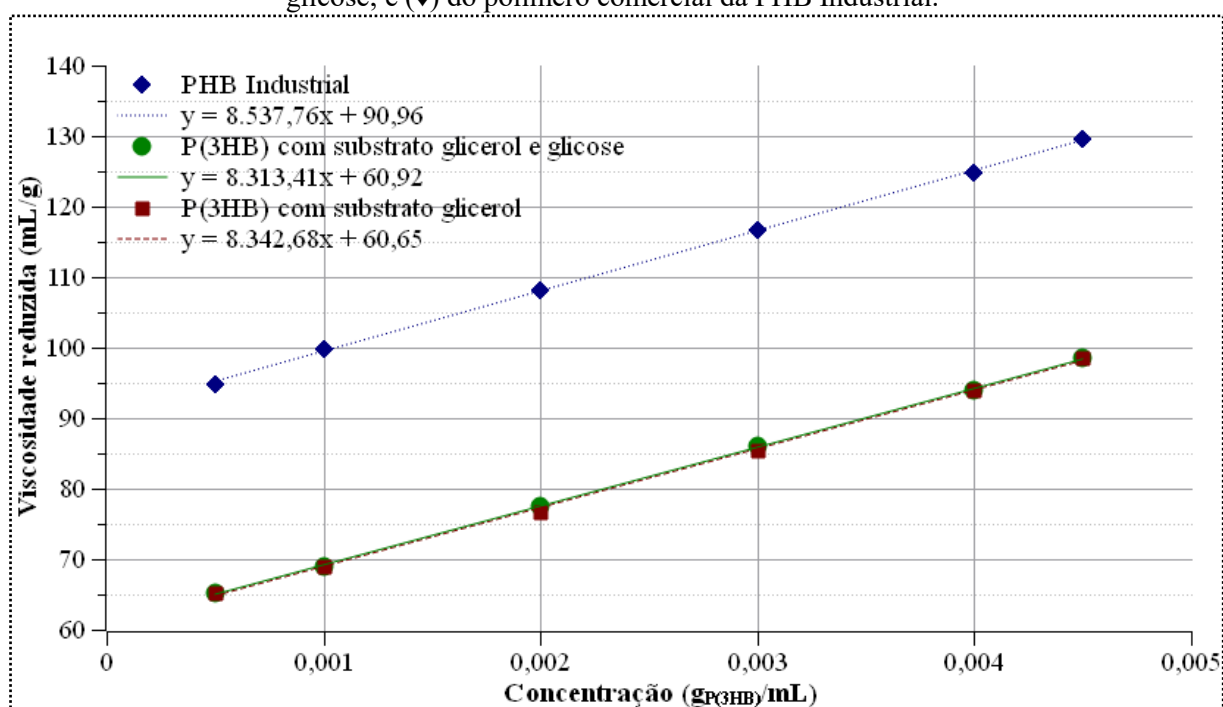
A viscosidade intrínseca, utilizada no cálculo da massa molar média (Equação 4), foi obtida através da extrapolação gráfica para a concentração tendendo a 0, do gráfico de viscosidade reduzida pela concentração de P(3HB) das soluções descritas na Tabela 3. A Figura 5 apresenta as retas para os três polímeros analisados e a Tabela 7 apresenta os resultados de viscosidade intrínseca e massa molar média de cada polímero analisado.

**Tabela 7** – Resultados das viscosidades intrínsecas e da massa molar média para os três polímeros analisados: polímeros obtidos (A) utilizando glicerol como substrato, (B) glicerol e glicose como substrato, e (C) polímero comercial da PHB Industrial.

Amostra	$\eta_i$ ( $\text{mL.g}^{-1}$ )	$\overline{M}_v$ ( $\text{g.mol}^{-1}$ )
A	60,65	$5,8 \times 10^4$
B	60,92	$5,9 \times 10^4$
C	90,96	$1,0 \times 10^5$

Para os dois biopolímeros extraído de *C. necator\_glpFK* neste trabalho não houve diferença aparentemente significativa na massa molar média, de  $5,8$  e  $5,9 \times 10^4$   $\text{g.mol}^{-1}$ , utilizando glicerol ou glicerol e glicose como substratos, respetivamente, cujos valores foram inferiores ao obtido para o polímero comercial da PHB Industrial, de  $1,0 \times 10^5$   $\text{g.mol}^{-1}$ .

**Figura 5** – Curva de viscosidade reduzida como função da concentração das soluções das amostras de P(3HB): extraídas de *C. necator\_glpFK* com os diferentes substratos: (■) glicerol e (●) glicerol e glicose; e (♦) do polímero comercial da PHB Industrial.



Leite (2004) reportou valores para os polímeros comerciais da PHB Industrial de  $6,4 \times 10^5$  e  $8,87 \times 10^5$   $\text{g.mol}^{-1}$  e da Sigma Aldrich de  $3,7 \times 10^5$   $\text{g.mol}^{-1}$ , enquanto  $6,3 \times 10^5$   $\text{g.mol}^{-1}$  foi obtido por Figueiredo *et al.*, (2014), valores superiores aos encontrados neste trabalho. Segundo Bastioli (2005) e Canevarolo (2013), um polímero submetido à alta temperatura pode levar a uma diminuição da massa molar e causar fragilidade, pois pode ocorrer rompimento das cadeias do polímero, formando outras de tamanho menor, com conseqüente mudança na estrutura química e redução da massa molar.

Pode-se dizer que os biopolímeros extraídos neste trabalho podem ter sofrido degradação térmica das suas cadeias poliméricas, diminuindo sua massa molar, pois foram extraídos a  $150$  °C por 45 min.

Por outro lado, Quines (2015) ao utilizar as mesmas condições de extração realizadas neste trabalho, porém com biomassa produzida por *C. necator* utilizando glicose e frutose como substratos, obteve massa molar de  $8,8 \times 10^4$  g.mol<sup>-1</sup> para o P(3HB). Apesar da ordem de grandeza ser a mesma, o valor da massa molar foi ligeiramente superior ao encontrado neste trabalho, indicando que o uso do glicerol como substrato pode diminuir a massa molar do P(3HB) produzido.

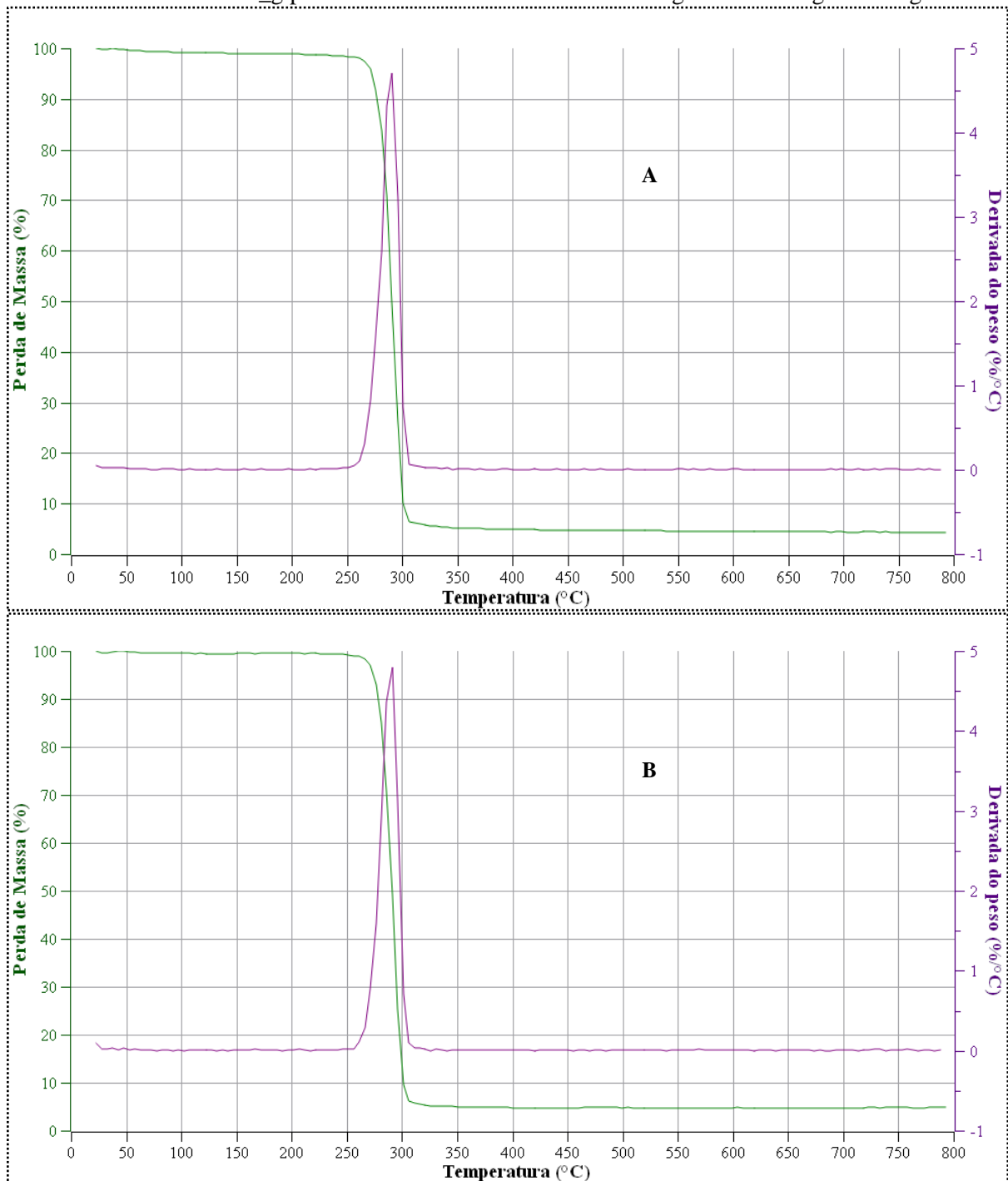
#### 4.4 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A Figura 6 apresenta as curvas de TGA das duas amostras de P(3HB) extraídos neste trabalho. Os resultados obtidos de temperatura de início de degradação ( $T_{\text{onset}}$ ), temperatura máxima de degradação ( $T_{\text{peak}}$ ) e porcentagem de perda de massa dos P(3HB)'s extraídos estão apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8** – Resultados de temperatura de início de degradação ( $T_{\text{onset}}$ ), temperatura máxima de degradação ( $T_{\text{peak}}$ ) e porcentagem de perda de massa determinados a partir das curvas de TGA das amostras de P(3HB) extraídas com os diferentes substratos: A = glicerol e B = glicerol e glicose.

<b>Amostra</b>	<b><math>T_{\text{onset}}</math> (°C)</b>	<b><math>T_{\text{peak}}</math> (°C)</b>	<b>Perda de massa (%)</b>
A	266,43	291,26	95,30
B	266,43	291,26	95,18

**Figura 6** – Curvas de TGA, termogravimetria e termogravimetria derivada, das amostras de P(3HB) extraídas de *C. necator\_glpFK* com os diferentes substratos: A = glicerol e B = glicerol e glicose.



A porcentagem de perda de massa observada na Tabela 8 representa a degradação total das amostras de P(3HB), sendo que a parte não degradada é referente às impurezas. Portanto, os resultados de pureza observados pela análise termogravimétrica (95,30 e 95,18% para A e B, respectivamente) confirmam o resultado de pureza encontrado pela cromatografia gasosa apresentada no item 4.1 (95% para ambas as amostras).

Pelos termogramas da Figura 6 (curvas verdes), observou-se que os dois polímeros extraídos de *C. necator\_glpFK* sofreram apenas um estágio de perda de massa, apresentando temperatura de início de degradação ( $T_{\text{onset}} = 266,43 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e temperatura máxima de degradação ( $T_{\text{peak}} = 291,26 \text{ }^\circ\text{C}$ ). O valor de  $T_{\text{peak}}$  foi determinado a partir da temperatura máxima do pico observado na primeira derivada da curva de TGA (curva roxa).

Abdelwahab (2012) reportou intervalo menor de degradação para o polímero comercial da PHB Industrial, de massa molar  $4,25 \times 10^5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , sendo  $T_{\text{onset}} = 260 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $T_{\text{peak}} = 279 \text{ }^\circ\text{C}$ , enquanto Farias (2009) observou valores maiores das temperaturas de degradação ( $T_{\text{onset}} = 282,4 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $T_{\text{peak}} = 310 \text{ }^\circ\text{C}$ ) para o mesmo polímero comercial. A diferença do estudo de Farias (2009) é que este autor realizou os testes de TGA em filmes de polímero comercial, solubilizados em clorofórmio seguido de evaporação do solvente, enquanto Abdelwahab (2012) realizou os testes com polímero comercial em pó.

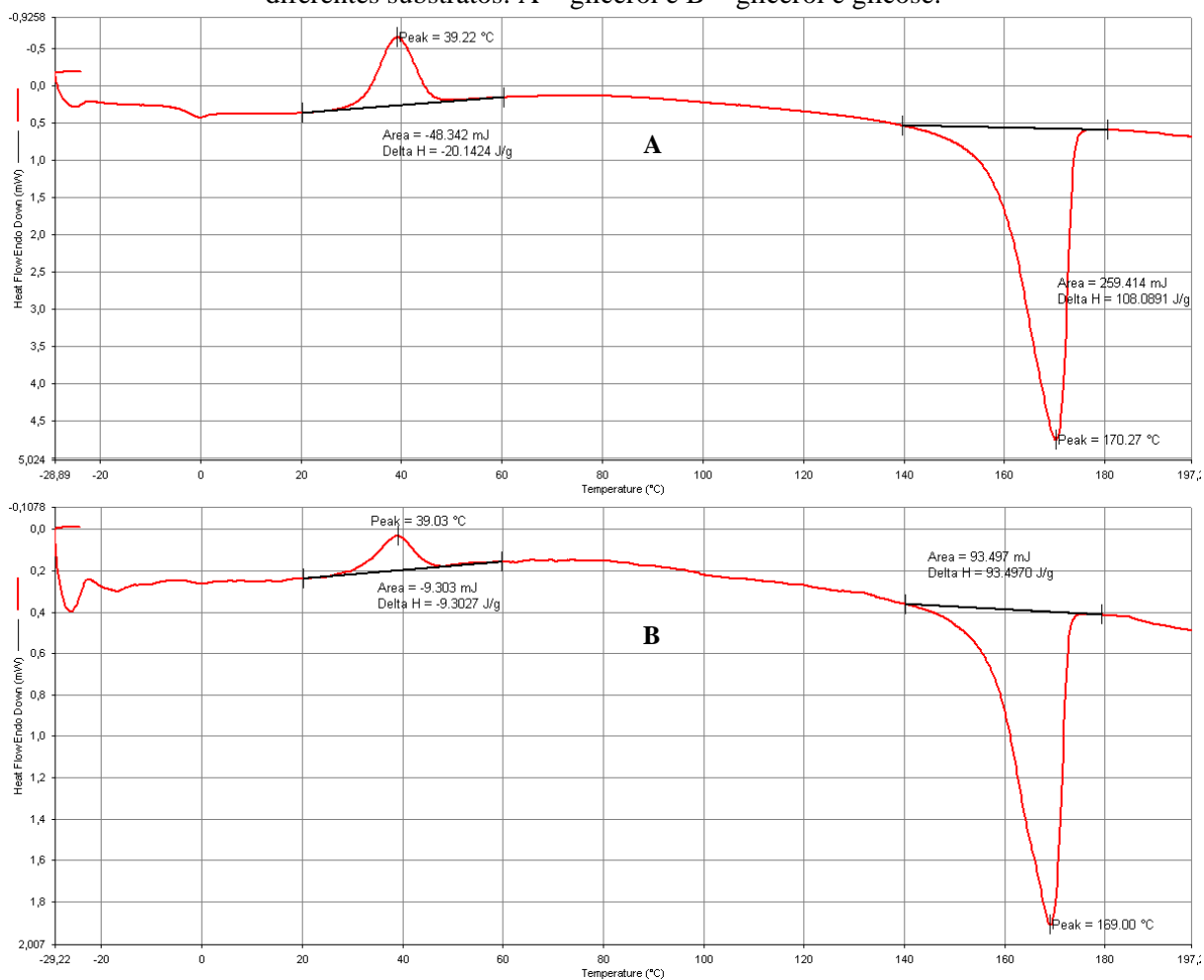
Os resultados encontrados no presente trabalho para as duas amostras analisadas foram iguais, indicando que não houve alteração na propriedade de degradação térmica e de pureza para as duas formas de obtenção de P(3HB) estudadas (tanto com glicerol como com glicerol e glicose associados). Além disso, os valores encontrados estão dentro dos reportados na literatura para o polímero comercial, com algumas variações.

#### 4.5 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

Os resultados da análise térmica por DSC dos biopolímeros extraídos neste trabalho estão apresentados na Figura 7.

É possível perceber a presença de dois picos de cristalização e fusão ( $T_c$  e  $T_m$ ), para as duas amostras, em  $39,22$  e  $39,03 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $T_c$ ) e  $170,27$  e  $169,00 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $T_m$ ), respectivamente para A e B. Apesar dos valores de picos de fusão serem semelhantes para os dois biopolímeros produzidos, para a amostra B, na qual foi utilizado glicose e glicerol para produção de P(3HB), não foi possível se obter o valor da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), a qual foi  $-0,82 \text{ }^\circ\text{C}$  para a amostra A. Isso pode ser explicado pela quantidade de amostra utilizada em cada análise. Para a amostra A foi utilizado  $3 \text{ mg}$ , enquanto que para a B foi utilizado somente  $1 \text{ mg}$  para a análise de DSC, portanto o erro pode ser maior para a amostra B.

**Figura 7** – Curvas de DSC para as amostras de P(3HB) extraídas de *C. necator\_glpFK* com os diferentes substratos: A = glicerol e B = glicerol e glicose.



A porcentagem de cristalinidade dos dois biopolímeros extraídos foi calculada a partir da equação 5. Os resultados de  $T_g$ ,  $T_m$  e  $X_c$  para as duas amostras estão expostas na Tabela 9.

**Tabela 9** – Resultados de temperatura de fusão ( $T_m$ ), temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), grau de cristalinidade ( $X_c$ ), e entalpias de fusão ( $\Delta H_m$ ), de cristalização ( $\Delta H_c$ ) e de fusão considerando o polímero 100 % cristalino ( $\Delta H_{m^0}$ ) obtidos por DSC, para os dois P(3HB) extraídos de *C. necator\_glpFK* com os diferentes substratos: A = glicerol e B = glicerol e glicose.

Amostras / Variáveis	$T_g$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)	$\Delta H_c$ (J/g)	$\Delta H_{m^0}$ (J/g)	$X_c$ (%)
<b>A</b>	-0,82	170,27	108,0891	20,1494	142,00	61,93
<b>B</b>	-	169,00	93,50	9,30	142,00	59,29

Tanadchangsang, Yu (2012), Rodríguez-Contreras *et al.* (2015) e Sombrio (2016) produziram P(3HB) com *C. necator* utilizando glicerol como substrato, e obtiveram resultados para  $T_m$  um pouco acima dos encontrados nesse trabalho, variando entre 172,7 – 173,9 °C,

enquanto os resultados de  $X_c$  foram semelhantes (59,9 – 65%). Quanto aos valores para o polímero comercial da PHB Industrial, Farias (2009) obteve valor de  $T_m$  de 175,4 °C e  $X_c$  de 64,4%, valores muito próximos dos encontrados nesse trabalho. Portanto, pode-se concluir que o processo de extração com carbonato de propileno reutilizado empregado neste trabalho não afetou as propriedades térmicas dos polímeros, as quais estão de acordo com a literatura.



## 5 CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo geral caracterizar o P(3HB) produzido por *C. necator\_glpFK*, a partir de glicerol e glicerol e glicose associados como substrato. Foi realizado um processo de extração dos biopolímeros, produzidos com os diferentes substratos, utilizando carbonato de propileno reutilizado como solvente, seguidos de operações unitárias para o isolamento do P(3HB), que, por fim, foi caracterizado quanto às propriedades químicas, físicas, morfológicas e térmicas.

Com os estudos realizados é possível concluir que o uso de glicerol como substrato não influencia a pureza e recuperação do polímero, sendo que a utilização do solvente carbonato de propileno reutilizado influenciou tanto na recuperação quanto na pureza do P(3HB) de *C. necator\_glpFK*. A recuperação (86%) e pureza (95%) mais elevadas foram obtidas para o polímero produzido utilizando glicerol como substrato.

Os biopolímeros extraídos neste trabalho foram confirmados como sendo P(3HB) através da caracterização dos grupamentos funcionais dos mesmos pela análise de FTIR, e foi possível concluir que o processo de extração a partir de cultivo de *C. necator\_glpFK* com carbonato de propileno reutilizado, não causou alterações químicas drásticas em sua cadeia polimérica.

Sob as condições de extração aplicadas no presente estudo (temperatura de extração de 150 °C, tempo de extração de 45 min e relação células/solvente de 0,15 g mL<sup>-1</sup>) foi observada que a alta temperatura empregada pode ter provocado rompimento das cadeias do polímero, formando outras de tamanho menor, com conseqüente mudança na estrutura química e redução da massa molar. Ainda que pode-se afirmar que a baixa massa molar média encontrada neste estudo se deve ao uso do glicerol como substrato, não há comprovações que o substrato utilizado ou o tratamento de extração realizado causaram individualmente ou combinados a diminuição da massa molar do P(3HB).

Em relação às propriedades térmicas, foi possível constatar que o uso do glicerol não afetou a estabilidade dos polímeros, que apresentaram temperatura de início de degradação e temperatura máxima de degradação em 266,43 e 291,26 °C. Intervalo semelhante ao que se encontra para polímeros comerciais. Quanto aos resultados de grau de cristalinidade e temperatura de fusão obtidos (170,27 e 169,00 °C ( $T_m$ ) e 61,93 e 59,29% ( $X_c$ ), foram comparados com a literatura por autores que também produziram P(3HB) utilizando glicerol como substrato, e também com valores para polímero comercial da PHB Industrial, sendo

concluído que o processo de extração com carbonato de propileno reutilizado empregado neste trabalho não afetou as essas propriedades térmicas dos polímeros, as quais estão de acordo com a literatura.

Com o método de extração realizado foi possível obter alta recuperação de P(3HB), a partir de *C. necator*\_glpFK, com elevada pureza e propriedades físicas semelhantes às reportadas na literatura para P(3HB), com uma diminuição da massa molar, utilizando-se um solvente ambientalmente mais indicado, e com a possibilidade de reutilização. Foi confirmado que o carbonato de propileno, solvente de baixa toxicidade, pode ser reutilizado no processo de extração, contribuindo para a redução dos custos de produção deste biopolímero, o que torna a extração de P(3HB) com este solvente mais competitiva no que se refere à economicidade do processo.

## **6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

A caracterização térmica e o conhecimento da massa molar do P(3HB), uma vez extraído, determina a adequação deste polímero para futuras aplicações, pois estas características conferem a ele grau de elasticidade, resistência e degradação. Por isso há a sugestão de que mais estudos de caracterização de polímeros produzidos utilizando glicerol como substrato sejam feitas, a fim que comprovar as alterações aqui apresentadas.

## 7 REFERÊNCIAS

ABDELWAHAB, M. A.; FLYNN, A.; CHIOU, B.-S.; IMAMC, S.; ORTS, W.; CHIELLINI, E. **Thermal, mechanical and morphological characterization of plasticized PLA–PHB blends.** *Polymer Degradation and Stability*, v. 97, p. 1822-1828, 2012.

AKHTAR, S.; POUTON, C. W.; NOTARIANNI, L. J. **The influence of crystalline morphology and copolymer composition on drug release from solution cast and melt-processed P(HB-HV) copolymer matrices.** *Journal of Controlled Release*, v. 17, p. 225-234, 1991.

ALVES, E. G. L.; REZENDE, C. M. de F.; SERAKIDES, R.; PEREIRA, M. M.; ROSADO, I. R. **Orthopedic implant of a polyhydroxybutyrate (PHB) and hydroxyapatite composite in cats.** *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 13, p. 546-552, 2011.

ANJUM, A.; ZUBER, M.; ZIA, K. M.; NOREEN, A.; ANJUM, M. N.; TABASUM, S. **Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: a review of recent advancements.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 89, p. 161-174, 2016.

APATI, G. P. **Síntese, caracterização e degradação de P(3HB) por *Cupriavidus necator*, utilizando glicerol como substrato.** Tese de Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

BARBIRATO, F.; HIMMI, E.H.; CONTE, T.; BORIES. A. **1,3-Propanediol production by fermentation: an interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries.** *Industrial Crops and Products*, v. 7, p. 281-289, 1998.

BASTIOLI, C. **Handbook of biodegradable polymers.** Rapra Technology Limited, 566p., 2005.

BUCCI, D. Z. **Avaliação de embalagens de PHB (Poli (ácido 3-hidroxibutírico)) para alimentos.** Dissertação de Mestrado em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

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

- CALVÃO, P. S. **Obtenção e caracterização de misturas do polímero biodegradável P[3HB] e seu copolímero P[3HB-co-3HV] com elastômeros.** Tese de Doutorado em Engenharia de Materiais, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- CANEVAROLO, S. V. **Ciência dos Polímeros: Um texto básico para tecnólogos e engenheiros.** 2. ed. São Paulo: ARTLIBER, 277 p., 2006.
- CANEVAROLO, S. V. **Ciência dos Polímeros.** 3. ed. São Paulo: ARTLIBER, p. 280, 2013.
- 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.
- CHEN, Z.; SONG, Y.; ZHANG, J.; LIU, W.; CUI, J.; LI, H.; CHEN, F. **Laminated electrospun nHA/PHB-composite scaffolds mimicking bone extracellular matrix for bone tissue engineering.** Materials Science & Engineering C, 2016.
- CORRÊA, M. P. **Extração do biopolímero P(3HB) com solvente renovável.** Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.
- DALCANTON, F. **Produção, extração e caracterização de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* em diferentes substratos.** Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- FARIAS, D. **Produção e caracterização de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por *Cupriavidus necator* em melaço cítrico.** Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- FIORESE, M. L. **Estratégias de cultivo e recuperação e caracterização de poli (3-hidroxibutirato) produzido por *Ralstonia eutropha*.** Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- FORMOLO, M. C.; DUARTE, M. A. T.; SCHNEIDER, A. L.; FURLAN, S. A.; PEZZIN, A. P. T. **Polihidroxialcanoatos: biopoliésteres produzidos a partir de fontes renováveis.** Revista saúde e Ambiente, v. 4, n. 2, p. 14-21, 2003.
- FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. **Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos.** Química Nova, v. 29, n° 4, p. 811-816, 2006.

HAHN, S. W.; CHANG, Y. K.; LEE, S. Y. **Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*.** Applied and Environmental Microbiology, v. 61, n°1, p. 34-39, 1995.

HAND, S.; GILL, J.; CHU, K. -H. **Phage-based extraction of polyhydroxybutyrate (PHB) produced from synthetic crude glycerol.** Science of the Total Environment, v. 557–558, p. 317-321, 2016.

HEJNA, A.; KOSMELA, P.; FORMELA, K.; PISZCZYK, L.; HAPONIUK, J. T. **Potential applications of crude glycerol in polymer technology—Current state and perspectives.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 66, p. 449-475, 2016.

KAPRITCHKOFF, F. M., BONOMI, A., MIRANDA, E. A., PRADELLA, J. G. C., MAIORANO, A. E., ZUCCOLO, M., SCHMIDELL, W. **Seleção de enzimas visando a lise da parede celular de *Ralstonia eutropha*.** In: XIII- SINAFERM - Simpósio Nacional de Fermentações, 2000.

KULKARNI, S.O.; KANEKAR, P.P.; NILEGAONKAR, S.S.; SARNAIK, S.S.; JOG, J.P. **Production and characterization of a biodegradable poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHB-co-PHV) copolymer by moderately haloalkalitolerant *Halomonas campisalis* MCM B-1027 isolated from Lonar Lake, India.** Bioresource Technology, v. 101, p. 9765–9771, 2010.

LEE, S. Y. **Bacterial polyhydroxyalkanoates.** Biotechnology and Bioengineering, v. 49, p. 1-14, 1996.

LEITE, H. M. E. **Formulação e caracterização de matrizes de Polihidroxibutirato para liberação controlada de fármacos.** Tese de Mestrado em Engenharia e Ciências dos Materiais, Campos dos Goytacazes, 2004.

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

MAIA, N. V. L. P. **Produção e caracterização de blendas poliméricas de (poli(3-hidroxibutirato)) (P(3HB)) e amido de milho na produção de plástico biodegradável.** Dissertação de Mestrado de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

- NARANJO, J. M.; POSADA, J. A.; HIGUITA, J. C.; CARDONA, C. A. **Valorization of glycerol through the production of biopolymers: the PHB case using *Bacillus megaterium***. *Bioresource Technology*, v. 133, p. 38-44, 2013.
- OJUMU, T. V.; YU, J.; SOLOMON, B. O. **Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer**. *African Journal of Biotechnology*, v.3 (1), p. 18-24, 2004.
- OSMAN, Y.; ELRAZAK, A. A.; KHATER, W. **Microbial biopolymer production by *Microbacterium* WA81 in batch fermentation**. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, v. 3, p. 250-262, 2016.
- PENLOGLOU, G., ROUSSOS, A., CHATZIDOUKAS, C., KIPARISSIDES, C. **A combined metabolic/polymerization kinetic model on the microbial production of poly(3-hydroxybutyrate)**. *New Biotechnology*, v. 27, p. 358-367, 2010.
- PHILIP, S.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. **Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications**. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 82, p. 233-247, 2007.
- PRABISHA, T.P.; SINDHU, R.; BINOD, P.; SANKAR, V.; RAGHU, K. G.; PANDEY, A. **Production and characterization of PHB from a novel isolate *Comamonas* sp. from a dairy effluent sample and its application in cell culture**. *Biochemical Engineering Journal*, v. 101, p. 150-159, 2015.
- QUINES, L. K. M. **Extração de poli(3-hidroxi-butirato), produzido por *Cupriavidus necator*, utilizando carbonato de propileno combinado com métodos mecânicos**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.
- QUINES, L. K. M.; SCHMIDT, M.; ZANFONATO, K.; SCHMIDELL, ARAGÃO, W.; G. M. F. **Métodos de extração de poli-hidroxi-alcenoatos a partir de biomassa bacteriana**. *Química Nova*, v. 38, nº 9, p. 1207-1218, 2015.
- RAMSAY, J. A.; BERGER, E.; VOYER, R.; CHAVARIE, C.; RAMSAY, B. A. **Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents**. *Biotechnology Techniques*, v. 8, p. 589-594, 1994.
- RAVEENDRAN, S.; NAGAPOOSAM, S.; PARAMESWARAN, B.; ASHOK P. **Pentose-rich hydrolysate from acid pretreated rice straw as a carbon source for the production of poly-3-hydroxybutyrate**. *Biochemical Engineering Journal*, v. 78, p. 67-72, 2013.

REOLON, T. M. **Determinação da viscosidade do biopolímero produzido pelo fungo nativo *Botryosphaeria rhodina* MMPI**. Trabalho de Conclusão de Curso de Bacharelado em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2011.

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

RODRÍGUEZ-CONTRERAS, A.; KOLLER, M.; DIAS, M. M. DE S.; CALAFELL-MONFORT, M.; BRAUNEGG, G.; MARQUÉS-CALVOA, M. S. **Influence of glycerol on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* and *Burkholderia sacchari***. *Biochemical Engineering Journal*, v. 94, p. 50-57, 2015.

SARATALE, G. D.; OH, M-K. **Characterization of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) produced from *Ralstonia eutropha* using an alkali-pretreated biomass feedstock**. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 80, p. 627-635, 2015.

SHARMA, P.; BAJAJ, B. K. **Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from *Bacillus cereus* PS 10**. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 81, p. 241-248, 2015.

SHINDU, R.; SILVIYA, N.; BINOD, P.; PANDEY, A. **Pentose-rich hydrolysate from acid pretreated rice straw as a carbon source for the production of poly-3-hydroxybutyrate**. *Biochemical Engineering Journal*, v. 78, p. 67-72, 2013.

SHRIVASTAV, A.; KIM, H. Y.; KIM, Y. R. **Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system**. *BioMed Research International*, p. 1-12, 2013.

SOMBRIO, B. R.; SCHOEREDER, T.; GARCIA, M. C. F.; APATI, G. P.; SCHNEIDER, A. L. S.; PEZZIN, A. P. T. **Produção de Poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator* em processo descontínuo alimentado com pulso de glicerol**. In: Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais – CBECiMat, nº 22, Natal, 2016.

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

TANADCHANGSAENG, N.; YU, J. **Microbial synthesis of polyhydroxybutyrate from glycerol: Gluconeogenesis, molecular weight and material properties of biopolyester**. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 109, n. 11, p. 2808-2818, 2012.



TIAN, J.; SINSKEY, A. J.; STUBBE, J. **Kinetic studies of Polyhydroxybutyrate granule formation in *Wautersia eutropha* H16 by transmission electron microscopy.** Journal of Bacteriology, v. 187, n° 11, p. 3814-3824, 2005.

TSUJI, H., IKADA, Y. **Blends of aliphatic polyesters. 1. Physical properties and morphologies os solution-cast blens from poly(DL-lactide) and poly( $\epsilon$ -caprolactone).** Journal of Applied Polymer Science, v. 60 p. 2367-2375, 1996.

URTUVIA, V.; VILLEGAS, P.; GONZÁLEZ, M.; SEEGER, M. **Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 70, p. 208-213, 2014.

WELLEN, R.M.R.; RABELLO, M.S.; FECHINE, G.J.M.; CANEDO, E.L. **The melting behaviour of poly(3-hydroxybutyrate) by DSC.** Reproducibility study, Polymer Testing, v. 32, p. 215-220, 2013.

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

XAVIER, J. R.; BABUSHA, S. T.; GEORGE, J.; RAMANA, K. V. **Material properties and antimicrobial activity of Polyhydroxybutyrate (PHB) films incorporated with vanillin.** Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015.

ZANFONATO, K. **Aproveitamento de subprodutos da indústria de biocombustíveis para produção de Poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha*.** Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.