



# SIMULAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) A PARTIR DE GLICEROL

CAMILA SILVA DE LIMA

VITOR LOUREIRO XIMENES

Projeto Final em Engenharia Química

Orientadores:

Professora Eliana Mossé Alhadef, D. Sc.

Professora Maria José de O. C. Guimarães, D. Sc.

Maio de 2011

# SIMULAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) A PARTIR DE GLICEROL

*Camila Silva de Lima*  
*Vitor Loureiro Ximenes*

Projeto Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro Químico.

Aprovado por:

---

Andréa Medeiros Salgado, D. Sc.

---

Mariana de O. Faber, Eng. de Bioprocessos

---

Eduardo A. Reif de Paula, Eng. Químico

Orientado por:

---

Eliana Mossé Alhadeff, D. Sc.

---

Maria José de O. C. Guimarães, D. Sc.

Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Maio de 2011.

Ximenes, Vitor Loureiro; Lima, Camila Silva de

Simulação do processo de produção de poli(3-hidroxi-butirato) a partir do glicerol / Camila Silva de Lima, Vitor Loureiro Ximenes. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2011.

xi, 56 p.; il

(Projeto Final) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2011.

Orientadores: Eliana Mossé Alhadef e Maria José de O. C. Guimarães.

1. Biopolímeros. 2. Glicerol. 3. Simulação. 4. Projeto Final. (Graduação – UFRJ/EQ) 5. Eliana Mossé Alhadef, Maria José de O. C. Guimarães. I. Simulação do processo de produção de PHB a partir do glicerol.

Dedicamos este trabalho aos nossos pais.

## AGRADECIMENTOS

Aos nossos pais, por toda dedicação e confiança.

Aos nossos irmãos, pela amizade e pelo companheirismo.

Às nossas famílias, pela presença constante.

Aos nossos amigos, pela companhia e compreensão durante toda essa caminhada.

A todos os professores da EQ.

Às nossas orientadoras, Eliana e Maria José, pela ajuda e compreensão.

A todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente na elaboração deste trabalho.

Resumo do Projeto Final apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Engenheiro Químico.

## **SIMULAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE POLI(3-HIDROXI-BUTIRATO) A PARTIR DE GLICEROL**

Camila Silva de Lima

Vitor Loureiro Ximenes

Maio, 2011

Orientadores: Professora Eliana Mossé Alhadef, D. Sc.  
Professora Maria José de O. C. Guimarães, D. Sc.

No presente trabalho foi estudada a viabilidade tecnológica de uma planta de produção de poli(3-hidroxibutirato) (PHB) a partir do glicerol como matéria-prima. O principal interesse neste biopolímero vem do fato deste ser biodegradável. Esta característica aliada à biocompatibilidade permite que o PHB, apesar de ainda apresentar um alto custo de produção, encontre nichos comerciais específicos, incluindo a área médica, sendo possível vislumbrar o avanço em áreas dominadas por polímeros de origem petroquímica, à medida que os processos de produção sejam otimizados. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e simular uma sequência de operações unitárias para a bioprodução, recuperação e purificação de PHB utilizando o glicerol como fonte de carbono. Para isso, buscou-se em artigos científicos dados sobre o processo fermentativo com esta matéria-prima e metodologias para as etapas posteriores de recuperação e purificação do produto. Em seguida, estes dados foram utilizados no software SuperPro Designer v. 5.1, que forneceu os balanços de massa, de energia, análise do tempo de batelada e de ciclo e a produtividade anual da planta proposta. Utilizou-se a bactéria *C. necator* na etapa de fermentação e um processo de digestão celular química para a recuperação do PHB, obtendo uma produção anual de 72,5 toneladas de PHB, com pureza de 98,9 %.

# ÍNDICE GERAL

---

Capítulo I – Introdução .....	1
1.1.    Objetivo .....	4
Capítulo II – Biopolímeros: Poli-hidróxi-alcanoatos .....	5
2.1.    Histórico .....	5
2.2.    Características dos PHAs .....	6
2.3.    Aplicação dos PHAs .....	11
2.4.    Biossíntese dos PHAs .....	13
2.5.    Métodos de extração do PHA .....	16
2.6.    O uso do glicerol como substrato .....	19
Capítulo III – Metodologia .....	23
3.1.    Software .....	23
3.2.    Microorganismo .....	24
3.3.    Etapa de fermentação .....	25
3.4.    Processo de recuperação e purificação .....	28
Capítulo IV – Resultados e discussão.....	31
4.1.    Fluxograma do processo .....	31
4.2.    Balanços de massa e dados de projeto dos equipamentos.....	33
4.2.1.    Biorreator .....	33
4.2.2.    Tanque de mistura 1 .....	35
4.2.3.    Centrífuga 1 .....	36
4.2.4.    Tanque de mistura 2.....	37
4.2.5.    Centrífuga 2 .....	38
4.2.6.    Tanque de mistura 3.....	39
4.2.7.    Centrífuga 3 .....	40

4.2.8. Spray Dryer .....	40
4.3. Análise da produtividade e do consumo de utilidades .....	42
Capítulo V – Conclusão .....	49
Referências Bibliográficas.....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Produção mundial de plásticos (fonte: PlasticsEurope Market Research Group). .....	3
Figura 2 – Produção mundial de plásticos em 2009 (fonte: PlasticsEurope Market Research Group). .....	3
Figura 3 – Células de <i>C. necator</i> contendo grandes quantidades de grânulos de PHA. A barra na figura representa 0,5 µm (fonte: Sudesh et al., 2000). .....	7
Figura 4 - Fragmento da estrutura do P(3HB) (fonte: Steinbüchel, 1995). .....	7
Figura 5 - Estrutura geral dos PHAs (fonte: Steinbüchel, 1995). .....	8
Figura 6 – (a) Estrutura genérica de copolímeros de polihidroxibutiratos. (b) Poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato) (PHB <sub>4</sub> B) (fonte: Steinbüchel, 1995). .....	9
Figura 7 – Esquema simplificado da biossíntese de PHA (Steinbüchel et al,1995). .....	14
Figura 8 - Esquema de reação da biossíntese do P(3HB) pela rota que envolve a ação sucessiva de três enzimas (fonte: Madison e Huisman, 1999). .....	15
Figura 9 - Rota metabólica envolvida na síntese e degradação de PHB na <i>C. necator</i> (fonte: Khanna et al. , 2005). .....	15
Figura 10 – Reação de transesterificação envolvida na produção de biodiesel (fonte: Ashby et al., 2011). .....	20
Figura 11 – PHB obtido em forma de pó ao final do processo de secagem, pela empresa Biocycle® (fonte: <a href="http://www.biocycle.com.br/">http://www.biocycle.com.br/</a> ) .....	30
Figura 12 – Fluxograma de uma planta de produção de PHB utilizando glicerol como fonte de carbono (fonte: SuperPro Designer v.5.1). .....	32
Figura 13 –Biorreator utilizado para produção de PHB na Biocycle® (fonte: <a href="http://www.biocycle.com">www.biocycle.com</a> ) .....	34
Figura 14 – (A) Representação esquemática do interior de uma centrífuga de discos; (B) Exemplo de uma centrífuga de discos industrial usada em processos biotecnológicos (fonte: <a href="http://www.westfalia-separator.com">www.westfalia-separator.com</a> ). .....	37
Figura 15 – Exemplo de um “spray dryer” (fonte: Changzhou Hengcheng First Drying Equipment Co., Ltd.) .....	42
Figura 16 – Gráfico do tempo de operação por equipamento, em duas bateladas consecutivas (fonte: SuperPro Designer v.5.1) .....	43

## ÍNDICE DE QUADROS

---

Quadro 1 – Principais PHAs e radicais “R” correspondentes (fonte: elaboração própria).....	8
Quadro 2 – Propriedades de PHAs e do polipropileno (fonte: Tsuge, 2002).....	10
Quadro 3 - Gêneros de microorganismos produtores de PHA (fonte: Ha e Cho, 2002).....	13
Quadro 4 – Métodos de recuperação do PHB (fonte: Jacquel et al., 2005).....	18
Quadro 5 – Produção de PHAs a partir de fontes de carbono de baixo custo.....	19
Quadro 6 – Reagentes na estequiometria da fermentação (fonte: elaboração própria).....	26
Quadro 7 – Produtos na estequiometria da fermentação (fonte: elaboração própria).....	26

## ÍNDICE DE TABELAS

---

Tabela 1 – Dados de projeto do biorreator.....	34
Tabela 2 – Balanço de massa no biorreator. ....	35
Tabela 3 – Dados de projeto do tanque de mistura 1. ....	35
Tabela 4 – Balanço de massa no tanque de mistura 1. ....	36
Tabela 5 – Balanço de massa na centrífuga 1. ....	36
Tabela 6 – Dados de projeto do tanque de mistura 2. ....	38
Tabela 7 – Balanço de massa no tanque de mistura 2.....	38
Tabela 8 – Balanço de massa na centrífuga 2. ....	38
Tabela 9 – Dados de projeto do tanque de mistura 3. ....	39
Tabela 10 – Balanço de massa no tanque de mistura 3. ....	40
Tabela 11 – Balanço de massa na centrífuga 3. ....	40
Tabela 12 – Dados de projeto do “spray dryer”. ....	41
Tabela 13 – Balanço de massa no “spray dryer”. ....	41
Tabela 14 – Dados gerais do processo. ....	43
Tabela 15 – Consumo de matérias-primas e insumos ....	45
Tabela 16 – Consumo anual de energia elétrica. ....	46
Tabela 17 – Consumo anual de vapor.....	47
Tabela 18 – Consumo anual de água de resfriamento.....	47
Tabela 19 – Consumo anual de água refrigerada.....	48

## NOMENCLATURA

---

3HB	3-hidroxibutirato
3HV	3-hidroxivalerato
3HHx	3-hidroxihexanoato
3HHep	3-hidroxiheptanoato
APME	Associação de Produtores de Plásticos da Europa
Da	Dalton (unidade de massa molecular relativa)
EPA	Agência de Proteção do Meio-Ambiente (EUA)
ICI	Imperial Chemical Industries
INP	Instituto Nacional do Plástico
lcl-PHA	Poli(hidroxialcanoato) de cadeia longa
mcl-PHA	Poli(hidroxialcanoato) de cadeia média
MM	Massa molar
NAFTA	Tratado Norte-Americano de Livre Comércio
PHA	Poli(hidroxialcanoato)
PHB	Poli(3-hidroxibutirato)
PHHx	Poli(3-hidroxihexanoato)
PHV	Poli(3-hidroxivalerato)
PP	Polipropileno
PHBV	Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)
PHB <sub>4</sub> B	Poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato)
PHBHx	Poli(3-hidroxibutirato-co-3hidroxihexanoato)
scl-PHA	Poli(hidroxialcanoato) de cadeia curta
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
T <sub>g</sub>	Temperatura de transição vítrea
T <sub>m</sub>	Temperatura de fusão

## CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

---

No atual estágio de desenvolvimento da humanidade, os materiais plásticos são indispensáveis para a realização das atividades mais comuns do cotidiano das pessoas. Observa-se um rápido e constante crescimento na demanda de materiais poliméricos com função de embalagem, para assegurar a distribuição segura e eficiente dos bens de consumo ao redor do mundo. Ainda, polímeros têm uma importância crescente como produtos para aplicações especiais, como por exemplo no campo da medicina.

O uso de matérias-primas de origem fóssil para a produção de polímeros promove um dos problemas ambientais de maior evidência dos dias de hoje. O aumento da emissão de gases do efeito estufa é tido como uma das principais causas do aquecimento global. Essas emissões são consequência destes materiais serem utilizados apenas durante um período relativamente curto e após isso serem incinerados, elevando a concentração atmosférica de CO<sub>2</sub>.

Quando não passam por esse processo de degradação térmica, esses materiais plásticos se acumulam, tanto em terra quanto em mar, gerando uma enorme quantidade de resíduos sólidos. Atualmente, o plástico participa, em média, de 7% a 8% da composição do lixo urbano no Brasil (INP, 2011). A sua disposição o torna um problema ambiental, já que se trata de um composto recalcitrante à degradação microbiana, devido ao excessivo comprimento das cadeias moleculares que o compõem. Isso faz com que os plásticos perdurem no ambiente por até 100 anos, com efeitos prejudiciais às populações em diversos níveis.

De acordo com o destino de descarte, os plásticos podem causar sérios efeitos aos seres vivos que nele habitam; como exemplo, há as mortes de milhões de seres marinhos anualmente, atribuídas ao acúmulo de plásticos nos mares. As tentativas nos últimos anos de tratamento destes resíduos, como incineração e reciclagem, ainda não fornecem bons resultados. A incineração, por se tratar de um procedimento caro e poluente; a reciclagem, pela dificuldade de classificação dos diversos tipos de plásticos existentes, pelos reduzidos programas de coleta seletiva, pelo custo superior ao da obtenção da matéria prima, e pela qualidade inferior à do material original obtida (Brandl et al., 1990).

A produção mundial de plásticos no início do século XXI superou a marca de 200 milhões de toneladas anuais, suprimindo a demanda de uma população de seis bilhões de habitantes. O aumento da demanda por materiais plásticos pode ser observado na Figura 1. Estima-se que a população na Terra chegue a dez bilhões de habitantes na metade deste século, aumentando proporcionalmente a produção de materiais plásticos (APME, 2003). Aliado ao crescimento do consumo devido ao aumento da população, também existe a pressão para aumento da produção, devido à melhoria no padrão de vida das pessoas. Um bom exemplo é o padrão de vida dos norte-americanos, que consumiam cerca de 91 kg de plástico por habitante em 2001 (EPA, 2003), mostrando a que níveis o consumo de plástico pode chegar em um país desenvolvido. Os países europeus atingiram o patamar dos 94 kg de plástico por habitante em 2002, enquanto que a Índia consumia 2 kg por habitante no mesmo ano (Reddy et al., 2003).

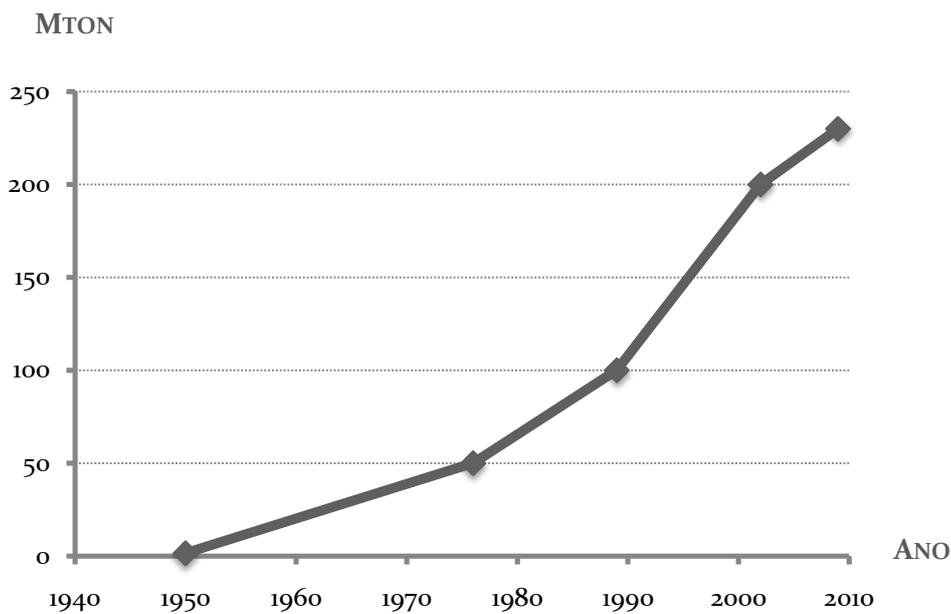


FIGURA 1 – PRODUÇÃO MUNDIAL DE PLÁSTICOS (FONTE: PLASTICSEUROPE MARKET RESEARCH GROUP).

Na Figura 2 vê-se a distribuição relativa da produção mundial de plásticos de acordo com regiões do mundo.

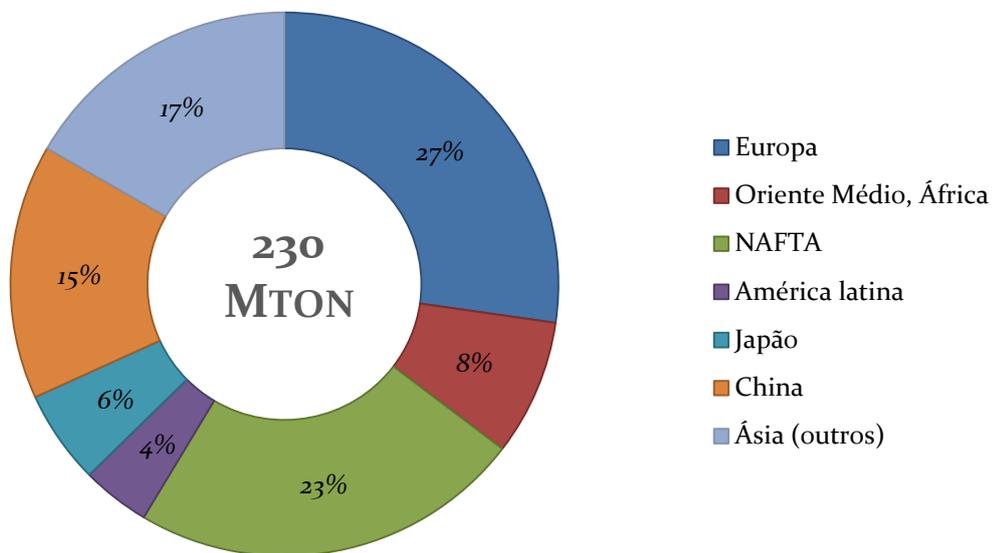


FIGURA 2 – PRODUÇÃO MUNDIAL DE PLÁSTICOS EM 2009 (FONTE: PLASTICSEUROPE MARKET RESEARCH GROUP).

É neste contexto que polímeros produzidos por microorganismos, mais especificamente os biopoliésteres, têm chamado a atenção por sua versatilidade e pela sua biodegradabilidade.

Contudo, o custo de produção desses materiais sempre foi alto demais e suas propriedades são em geral inferiores às dos polímeros de origem petroquímica. Essas desvantagens, no entanto, não impediram que a pesquisa nesse campo continuasse, tampouco impediram o surgimento de algumas plantas em escalas piloto e industrial ao redor do mundo. Por exemplo, o Brasil produz PHAs (Polihidroxialcanoatos) em escala piloto no interior de São Paulo, com um processo de produção de PHAs integrada a uma usina de produção de açúcar e álcool (Nonato et al., 2001), indicando que o país é detentor de tecnologia na área de produção de biopolímeros.

Um dos atrativos da produção de PHAs por microorganismos é a enorme variedade de substratos que pode ser empregada como fonte de carbono (Reddy et al., 2003; Finkler, 2006). Por exemplo, podem ser usados como substratos: fontes renováveis (sacarose, amido, celulose e trigliceróis), combustíveis fósseis (metano, óleo mineral e carvão), sub-produtos da agroindústria (melaço, soro de queijo, glicerol e rejeitos da agroindústria), produtos químicos (ácido propiônico, ácido acrílico e ácido 4-hidróxi-butírico) e gás carbônico.

## **1.1. OBJETIVO**

Este Projeto Final teve como objetivo simular uma planta de produção de um tipo específico de PHA, o poli-3-hidroxibutirato, utilizando como substrato o glicerol, proveniente da indústria de biodiesel. As operações unitárias envolvidas no processo foram divididas em duas seções distintas, uma seção de fermentação, e uma seção de recuperação e purificação do biopolímero.

Para realizar a simulação do processo, utilizou-se o software SuperPro Designer 5.1, o qual gerou o fluxograma do processo e realizou os balanços de massa.

## CAPÍTULO II – BIOPOLÍMEROS: POLI-HIDRÓXI-ALCANOATOS

---

### 2.1. HISTÓRICO

Os biopoliésteres foram descobertos em 1926, quando o microbiologista francês Maurice Lemoigne, do Instituto Pasteur, observou a presença de poli-3-hidroxi-3-oxibutanoato (PHB) em bactérias do gênero *Bacillus* (Lemoigne, 1926). Porém, durante décadas, o PHB foi apenas uma curiosidade acadêmica e, somente em 1962, foram obtidas as primeiras patentes para sua produção empregando bactérias (Brandl et al., 1990).

Por muitos anos, o ácido-3-hidroxi-2-butenóico (3HB) foi a única unidade métrica conhecida do grupo dos polihidroxi-alcenoatos, até que em 1964, identificou-se o ácido-3-hidroxi-2-butenóico produzido por uma bactéria do gênero *Nocardia*. Em 1972, a partir de estudos com lodo de esgoto, foi verificada a presença de outros constituintes, como os ácidos 3-hidroxi-2-metil-3-oxibutanoato (3HMV), 3-hidroxi-2-metil-3-oxipentanoato (3HMP) e 3-hidroxi-2-metil-3-oxihexanoato (3HMHx). Em 1976, a empresa inglesa Imperial Chemical Industries (ICI) iniciou estudos para a produção de

poli-3-hidroxi-butirato, a partir da linhagem *Cupriavidus necator*, como uma alternativa aos plásticos obtidos do petróleo e constatou que a incorporação de unidades 3-hidroxi-valerato à cadeia polimérica permitia modular as propriedades físicas e mecânicas do polímero produzido, ampliando suas possíveis aplicações. Registrada a patente, em 1981, a ICI começou a produção industrial de PHA, de P3HB e de P3HB-co-3HV, que receberam comercialmente o nome de Biopol<sup>®</sup> (Byrom, 1992; Silva et al., 2001).

Desde 2004, a Procter e Gamble (P&G) tem desenvolvido e comercializado um polímero de PHA denominado Nodax, o qual consiste num copolímero de PHA contendo 3HB e outras unidades de 3HA tendo grupos laterais maiores do que três átomos de carbono, utilizando espécies de microorganismos modificadas geneticamente para a produção deste polímero (Noda et al., 2004).

## 2.2. CARACTERÍSTICAS DOS PHAS

Os biopoliésteres são polímeros biodegradáveis que podem ser produzidos a partir de matérias-primas renováveis, como o açúcar de cana, materiais amiláceos e óleos vegetais. Eles se acumulam na forma de grânulos em inúmeras bactérias (Figura 3) como material de reserva de carbono e energia, quando estes microorganismos são submetidos a condições de limitações de nutrientes essenciais e excesso de fornecimento de fonte de carbono (Khanna e Srivastava, 2005).

Os polihidroxi-alcanoatos são poliésteres isotáticos (os ramos são ordenados regularmente do mesmo lado da cadeia) que apresentam um peso molecular variando de  $2.10^5$  a  $3.10^6$  g/mol, sendo que o mais comum dentre eles é o poli-3-hidroxi-alcanoato (P3HB) (Sudesh et al., 2000), cuja estrutura química é apresentada na Figura 4.

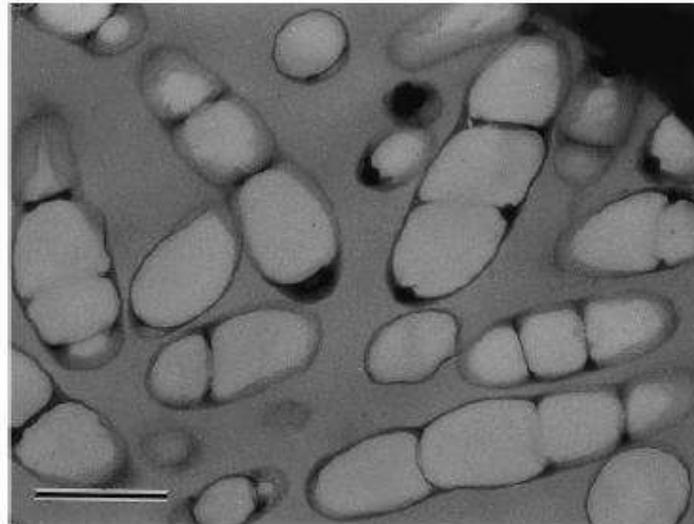


FIGURA 3 – CÉLULAS DE *C. necator* CONTENDO GRANDES QUANTIDADES DE GRÂNULOS DE PHA. A BARRA NA FIGURA REPRESENTA 0,5 μm (FONTE: SUDESH ET AL., 2000).

Ao lado do PHB, há uma grande variedade de outros PHAs, que podem ser representados de uma maneira genérica como na Figura 5. Nela, o grupamento pendente (R) pode variar de um radical metil (C<sub>1</sub>) até um tridecil (C<sub>13</sub>). Entretanto, os polímeros mais comuns são os com 4, 5 e 6 carbonos.

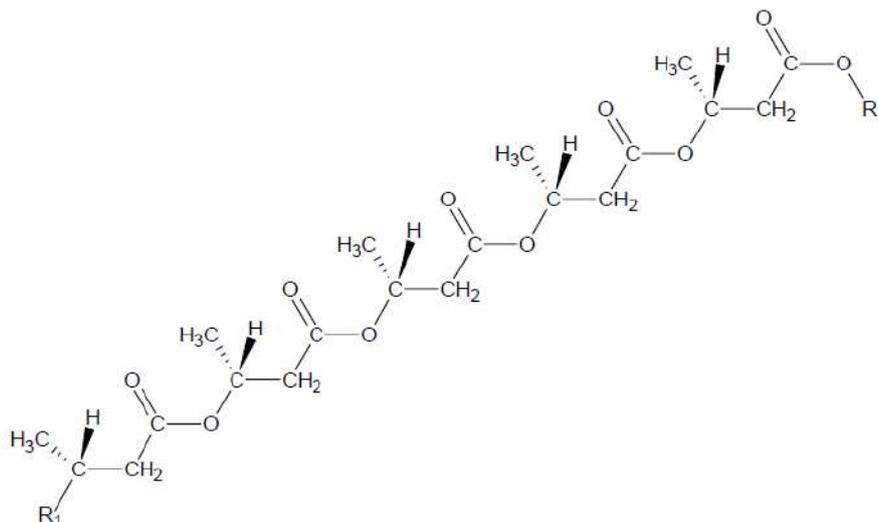


FIGURA 4 - FRAGMENTO DA ESTRUTURA DO P(3HB) (FONTE: STEINBÜCHEL, 1995).

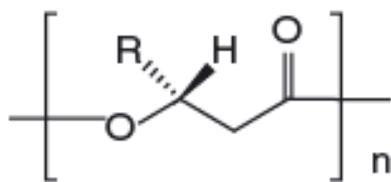


FIGURA 5 - ESTRUTURA GERAL DOS PHAS (FONTE: STEINBÜCHEL, 1995).

Os valores de “n” (Figura 5) dependem do radical R presente e do microorganismo onde o polímero é produzido, estando tipicamente dentro da faixa de 100 a 3000 monômeros (Lee, 1996). O Quadro 1 a seguir mostra o radical “R” (na Figura 5), o nome completo e a abreviatura utilizada desses três PHAs mais comuns.

QUADRO 1 – PRINCIPAIS PHAS E RADICAIS “R” CORRESPONDENTES (FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA).

Radical “R”	Nomenclatura	Abreviatura
CH <sub>3</sub>	Poli(3-hidroxi-butirato)	PHB
CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Poli(3-hidroxi-valerato)	PHV
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Poli(3-hidroxi-hexanoato)	PHHx

O PHB e o PHV formam um grupo tipicamente referido como short-chain-length PHAs (scl-PHAs), ou seja, são PHAs de cadeia curta. Já os que possuem de 6 a 14 carbonos são chamados de medium-chain-length PHAs (mcl-PHAs), PHAs de cadeia média, e os que possuem 15 ou mais carbonos são os long-chain-length PHAs (lcl-PHAs), PHAs de cadeia longa (Lee, 1996).

Copolímeros do PHB são formados quando utiliza-se uma mistura de substratos, como uma mistura de glicose e valerato. Os microorganismos então convertem essa mistura em scl-PHAs, como o poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBV) ou o poli(3-hidroxi-butirato-co-4-hidroxi-butirato) (PHB<sub>4</sub>B) (Lee, 1996). Ainda, a produção de copolímeros PHBH<sub>x</sub>, que contém

unidades de 3-hidroxihexanoato, e outros copolímeros de cadeia média vem sendo reportadas (Park et al., 2005).

A Figura 6 mostra as estruturas de copolímeros mais comumente encontrados na literatura.

As propriedades físicas e mecânicas dos biopoliésteres, como rigidez, ductilidade, ponto de fusão, temperatura de transição vítrea e resistência a solventes orgânicos variam consideravelmente, em função da composição monomérica. A temperatura de fusão ( $T_m$ ) e a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) estão intimamente relacionadas à estrutura dos monômeros e à quantidade de comonômeros, em copolímeros. Os PHAs tornam-se altamente viscosos e moldáveis em temperaturas próximas, ou acima, de seu ponto de fusão. As  $T_g$  e  $T_m$  aumentam com o aumento da massa molar (MM), para aqueles com baixa MM. Porém, este comportamento é invertido no caso daqueles com alta massa molar (Steinbuechel, 1996).

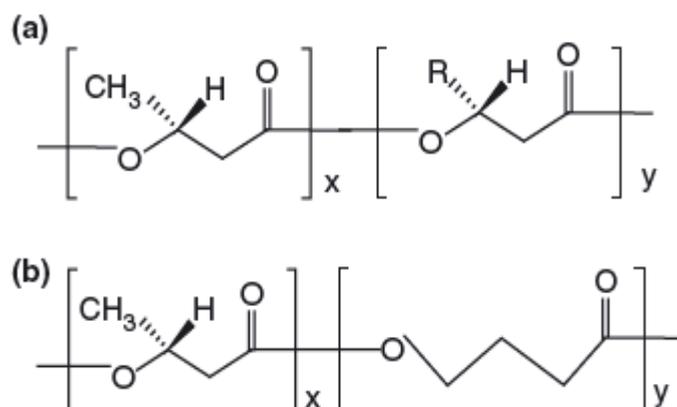


FIGURA 6 – (A) ESTRUTURA GENÉRICA DE COPOLÍMEROS DE POLIHIDROXIBUTIRATOS. (B) POLI(3-HIDROXIBUTIRATO-CO-4-HIDROXIBUTIRATO) (PHB<sub>4</sub>B) (FONTE: STEINBÜCHEL, 1995).

O Quadro 2 apresenta uma comparação entre as propriedades dos biopolímeros PHB, PHBV, PHB<sub>4</sub>B, PHBHx e do polímero polipropileno (PP).

QUADRO 2 – PROPRIEDADES DE PHAS E DO POLIPROPILENO (FONTE: TSUGE, 2002).

PROPRIEDADES	PHB	PHBV	PHB <sub>4</sub> B	PHBHx	PP
Temperatura de fusão (°C)	177	145	150	127	176
Temperatura de transição vítrea (°C)	2	-1	-7	-1	-10
Cristalinidade (%)	60	56	45	34	50-70
Força de tensão (MPa)	43	20	26	21	38
Elongamento na ruptura (%)	5	50	444	400	400

Os PHAs apresentam propriedades piezoelétricas, assim como outros biopolímeros (polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos). Estas propriedades dependem do nível de cristalinidade e da temperatura; elas determinam a geração de carga na superfície dos cristais, devido à sua polarização por forças cisalhantes. Além disso, os PHAs são atóxicos e biocompatíveis, apresentando uma biodegradação lenta e alta estabilidade à hidrólise em tecidos estéreis. A degradação de P(3HB) produz o ácido R-3-hidroxi-butírico, que é constituinte normal do sangue humano. Estudos com este ácido, obtido da hidrólise do P(3HB), mostraram que o mesmo pode ser usado como um suprimento de carbono intravenoso ou oral, com vantagens sobre a glicose (Asrar et al., 2002).

Outra característica de interesse nos PHAs é a sua biodegradabilidade. Microorganismos presentes na natureza são capazes de degradar os PHAs utilizando PHA hidrolases e PHA depolimerases (Choi et al., 1997).

A atividade dessas enzimas pode variar e vai depender da composição do polímero e das condições a que ele é submetido. Portanto a taxa de biodegradação dos PHAs é função de vários fatores, como população microbiana presente no ambiente, temperatura, umidade, pH, nutrientes presentes no meio, cristalinidade, aditivos e área superficial dos polímeros. Estes polímeros são sólidos insolúveis em água, enquanto as depolimerases são enzimas solúveis. Por isso, a degradação acontece através de uma reação heterogênea em duas etapas. A primeira é a de adsorção da enzima na superfície do polímero, e a segunda, a de

hidrólise das cadeias poliméricas, no sítio ativo da enzima. A hidrólise sempre ocorre em uma superfície reacional, entre as enzimas adsorvidas e sítios de adsorção livres (Khanna et al., 2005).

Além dos fatores citados acima, a degradação dos PHAs é fortemente dependente da estrutura do polímero, já que as depolimerases são enzimas altamente específicas, quanto ao substrato, e também apresentam estereoseletividade. O tamanho da cadeia também influencia, diminuindo a taxa de degradação e dificultando o crescimento microbiano, devido ao aumento da hidrofobicidade. A biodegradabilidade dos PHAs vem sendo avaliada pelo monitoramento de propriedades de amostras analisadas, como resistência mecânica e massa molar. Estudos relacionando sua biodegradabilidade com condições empregadas no meio mostraram resultados bastante variáveis. Para um filme de um copolímero formado por PHB<sub>4</sub>B, foram verificadas variações no tempo, para completa decomposição, de 2 a 25 semanas (Anderson et al., 1990). Para um filme de PHB, variações de 0,5 a 50 semanas foram verificadas (Asrar et al., 2002).

### **2.3. APLICAÇÃO DOS PHAS**

A grande maioria das aplicações dos PHAs são agindo como substitutos de polímeros petroquímicos. Os plásticos utilizados atualmente como embalagens e materiais de revestimento podem ser parcialmente ou até totalmente substituídos pelos PHAs. A ampla faixa de propriedades físicas observada nos PHAs e a possibilidade de melhoria na sua performance através de modificações químicas ou “blending”, propicia um universo extenso de potenciais aplicações (Zinn et al., 2005).

É possível identificar dois mercados potenciais de aplicação do material desenvolvido. O de maior volume, na área de embalagens e materiais descartáveis produzidos por injeção em moldes e extrusão de filmes, dominado por “commodities” petroquímicos no qual o preço de venda da resina e sua boa

processabilidade em escala industrial são os requisitos principais. O objetivo nesse mercado é atingir um nicho “verde”, onde o caráter de biodegradabilidade do produto justifica um diferencial de preço superior aos polímeros de origem petroquímica. O tamanho desse mercado é extremamente elevado, principalmente, se forem conseguidas as características de processabilidade compatíveis com as plantas industriais que hoje são utilizados no processamento dos polímeros convencionais. Dessa maneira, sua viabilidade requer a superação de gargalos relacionados às propriedades físico-químicas dos polímeros, como a temperatura de processamento muito próxima da temperatura de degradação do produto, a alta cristalinidade (60 a 90%), o baixo alongamento e a baixa resistência ao impacto (rigidez) (Vanzin, 2006).

O polímero biodegradável pode ser utilizado em diversas áreas, sendo o enfoque central de sua aplicação para embalagens descartáveis. No entanto, em âmbito mundial, polímeros desta natureza tem sido foco de grande interesse da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos métodos de administração de drogas através de sistemas de liberação controlada para constituintes ativos. Os mercados farmacêutico-hospitalar, alimentício e cosmético compreendem aplicações como aparatos, implantes médicos e matrizes para liberação controlada de princípios ativos, cosméticos, medicamentos e suplementos alimentares. Nesses mercados, além da biodegradabilidade, a biocompatibilidade e alta pureza também são requeridas. O atual custo de produção de PHB já seria competitivo, requerendo-se, entretanto, avanços relativos à garantia de pureza necessária e o desenvolvimento de técnicas de microencapsulação adaptadas a esse polímero (Vanzin, 2006).

## 2.4. BIODISSÍNTese DOS PHAs

Os PHAs são armazenados como grânulos insolúveis no citoplasma de um grande número de gêneros de bactérias e de alguns membros da família das Halobacteriaceae e das Archaeas. No Quadro 3 são apresentados alguns gêneros das bactérias que produzem PHAs.

QUADRO 3 - GÊNEROS DE MICROORGANISMOS PRODUTORES DE PHA (FONTE: HA E CHO, 2002).

<i>Acinetobacter</i>	<i>Gamphosphaeria</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Actinomycetes</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Ralstonia</i>
<i>Actinomycetes</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Halobacterium</i>	<i>Rhodobacter</i>
<i>Aphanothece</i>	<i>Hypomicrobium</i>	<i>Rhodospirillum</i>
<i>Aquaspirillum</i>	<i>Lamprocytis</i>	<i>Sphaerotilus</i>
<i>Azospirillum</i>	<i>Lampropedia</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Azobacter</i>	<i>Leptothrix</i>	<i>Spirulina</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Beggiatoa</i>	<i>Methylocystis</i>	<i>Syntrophomonas</i>
<i>Beijerinckia</i>	<i>Methylosinus</i>	<i>Thiobacillus</i>
<i>Caulobacter</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Thiocapsa</i>
<i>Chloroflexus</i>	<i>Microcoleus</i>	<i>Thiocystis</i>
<i>Chlorogloea</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Thiodictyon</i>
<i>Chromobacterium</i>	<i>Mycoplana</i>	<i>Thiopedia</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Nitrobacter</i>	<i>Thiosphaera</i>
<i>Cupriavidus</i>	<i>Nitrococcus</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Derxia</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Xanthobacter</i>
<i>Ectothiorhodospira</i>	<i>Oceanospirillum</i>	<i>Zoogloea</i>
<i>Escherichia</i>	<i>Paracoccus</i>	
<i>Ferrobacillus</i>	<i>Phothobacterium</i>	

A natureza foi sábia ao escolher os polímeros como a forma de armazenar o carbono e a energia, uma vez que as longas cadeias dos PHAs os tornam insolúvel no citoplasma do microorganismo, evitando então o problema de pressão osmótica, que existiria caso o armazenamento fosse realizado em número muito maior de moléculas pequenas (Zinn et al., 2001).

O metabolismo é o conjunto dos mecanismos químicos necessários ao organismo para a formação, desenvolvimento e renovação das estruturas celulares, para a produção da energia necessária para as manifestações interiores e exteriores da vida e para as reações bioquímicas. Observando o processo

genérico de biossíntese dos PHAs (Figura 7), três fases podem ser claramente identificadas. A primeira representa a absorção de uma fonte de carbono passível de participar da biossíntese do PHA. Essa absorção pode ser realizada por um sistema de transporte específico ou por difusão através da membrana celular. Uma segunda etapa é constituída por reações anabólicas e/ou catabólicas, responsáveis pela geração de compostos do tipo hidróxi-acil coenzima-A tioéster, que são substratos para a PHA sintase. Na terceira etapa ocorre a biossíntese do PHA, quando as PHA sintases usam os tioésteres como substratos e catalisam a formação da ligação éster do polímero, em concomitância com a liberação da coenzima-A (Sudesh et al., 2000).

O esquema de reações da rota que parte da acetil-coenzima-A (AcCoA) e que emprega as enzimas  $\beta$ -cetotiolase (P( $\beta$ HB)A) e acetoacetil-coenzima-A redutase (P( $\beta$ HB)B) é apresentado na Figura 8. Esse mecanismo está presente em várias bactérias, em especial em *C. necator* e em *A. latus* (Sudesh et al., 2000).

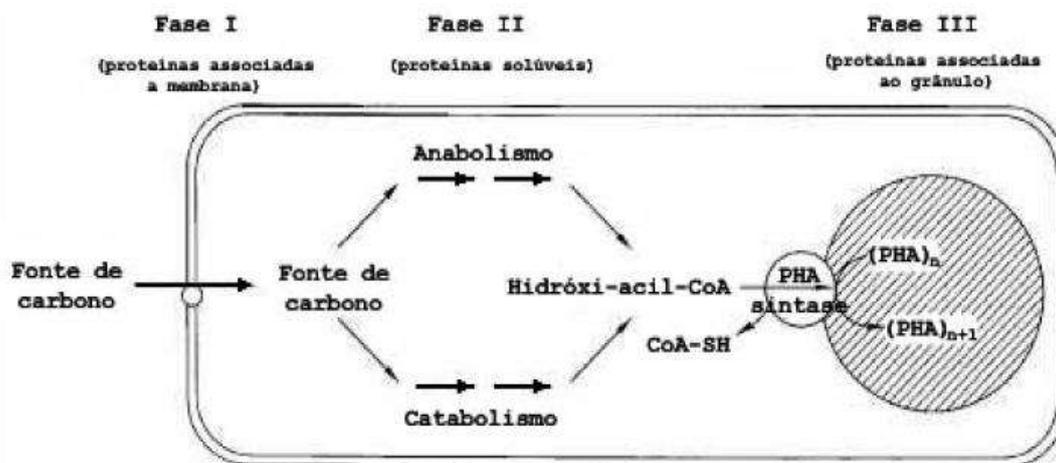


FIGURA 7 – ESQUEMA SIMPLIFICADO DA BIOSÍNTESE DE PHA (STEINBÜCHEL E VALENTIN, 1995).

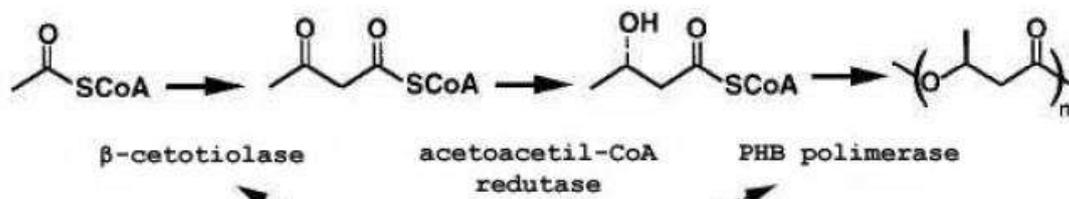


FIGURA 8 - ESQUEMA DE REAÇÃO DA BIOSÍNTESE DO P(3HB) PELA ROTA QUE ENVOLVE A AÇÃO SUCESSIVA DE TRÊS ENZIMAS (FONTE: MADISON E HUISMAN, 1999).

A primeira reação é promovida pela enzima  $\beta$ -cetoacilcoenzima-A tiolase (tio). A reação consiste na condensação de duas moléculas de acetilcoenzima-A (AcCoA) em uma molécula de aceto-acetil-coenzima-A (AcAcCoA), liberando uma molécula de coenzima-A (CoA). A segunda reação é a redução da aceto-acetil-coenzima-A para (R)-3-hidroxi-butilil-coenzima-A (3HBCoA) pela ação da enzima NADPH dependente aceto-acetil-coenzima-A desidrogenase (red). Finalmente, os monômeros são polimerizados em P(3HB) pela P(3HB) polimerase (pol) na terceira reação, liberando outra molécula de acetil-coenzima-A (Madison e Huisman, 1999). As vias metabólicas de formação e degradação do PHB podem ser vistas na Figura 9.

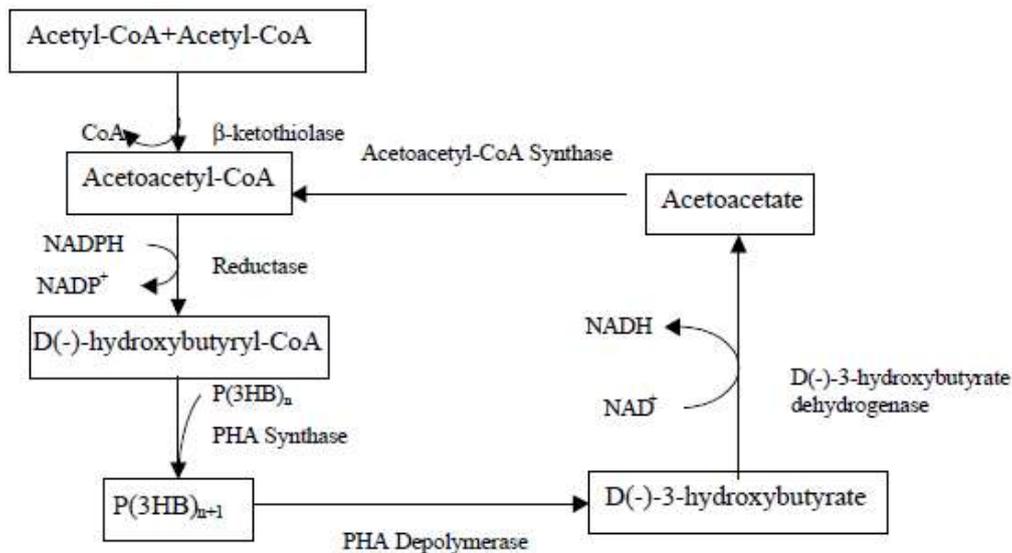


FIGURA 9 - ROTA METABÓLICA ENVOLVIDA NA SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE PHB NA *C. NECATOR* (FONTE: KHANNA ET AL. , 2005).

## 2.5. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DO PHA

Como o biopolímero é um produto intracelular, os métodos adotados para extração e purificação do P(3HB) contribuem significativamente para o desenvolvimento e economia global do processo (Nonato et al., 2001). Uma técnica que permita um processo simples, eficiente e menos poluente para a recuperação de P(3HB) é uma proposta necessária e atrativa.

Após o cultivo, as células contendo PHA's são separadas por processos convencionais, tais como centrifugação, filtração ou floculação-centrifugação. Em seguida, as células precisam ser rompidas para a extração do polímero. Há vários métodos desenvolvidos para essa extração, a maior parte aplicados à produção por *C. necator*.

A maioria dos processos utiliza solventes orgânicos como clorofórmio, carbonato de propileno e dicloroetano (Kessler et al., 2001). Pela alta viscosidade de soluções contendo PHA's, são necessárias grandes quantidades de solvente tóxico e/ou volátil (aproximadamente 20 partes de solvente para 1 parte de polímero), o que não apenas aumenta o custo total de produção como também causa danos ao meio ambiente (Choi e Lee, 1999).

Como uma alternativa para extração com solvente, um método diferente desenvolvido pela Imperial Chemical Industries (Chen et al., 1999) envolveu um tratamento térmico das células contendo P(3HB), seguido por digestão enzimática e lavagem com um surfactante aniônico para dissolver os materiais celulares não-PHB. Este processo é complicado, mesmo que os detalhes do processo de extração não estejam disponíveis, o custo relativamente alto das enzimas e o requerimento dos passos de digestão adicional para aumentar a pureza, resultariam em um custo alto de recuperação.

Outros métodos estudados envolveram o uso de hipoclorito de sódio para a digestão do material celular não-PHB. Entretanto, durante esta digestão houve grande degradação de P(3HB), podendo resultar em 50% de redução da massa molar. Porém, o uso de hipoclorito de sódio, juntamente com um surfactante

reduziu significativamente esta degradação. Normalmente, obtém-se um polímero com pureza maior que 95% a partir deste processo (Lee, 1996). No processo de extração de P(3HB) utilizando uma dispersão de hipoclorito de sódio e clorofórmio, Hahn et al., (1994) obtiveram 91% de recuperação de polímero com 97% de pureza utilizando uma solução de hipoclorito de sódio 30%, um tempo de tratamento de 90 minutos e utilizando metanol para precipitar o biopolímero.

A empresa ZENECA desenvolveu um processo de extração diferente, como uma alternativa à extração com solvente, para a produção industrial de P(3HB) e P(3HB-co-3HV). Neste processo, primeiramente as células sofreram um tratamento térmico que provocava a lise celular e a desnaturação de ácidos nucléicos que poderiam interferir nos passos subsequentes. Na sequência, foram tratadas com uma mistura de várias enzimas hidrolíticas como lisoenzimas, fosfolipases, lecitinases, proteinases, entre outras. A maior parte do material celular foi hidrolisado por essas enzimas, enquanto o polímero permaneceu intacto. Após a lavagem e a floculação, o polímero foi extraído como um pó branco, que foi convertido em chips para ser comercializado (Kessler et al., 2001). Entretanto, o elevado custo das enzimas e a necessidade de passos adicionais de digestão resultaram em maior custo de extração por esse processo (Choi e Lee, 1999).

Choi e Lee, (1999) desenvolveram um método simples de digestão alcalina para extrair P(3HB) a partir de *E. coli* recombinante. Quando as células de *E. coli*, contendo 77% de P(3HB), foram tratadas com NaOH 0,2 M a 30°C durante 1 hora, o P(3HB) foi extraído com uma pureza de 98,5%. Empregando o método de digestão alcalina, o custo de produção de P(3HB) foi 25% menor que o obtido empregando o método de digestão por surfactante e hipoclorito.

Chen et al., (1999) desenvolveram um processo que envolvia o uso de solução aquosa de surfactante-quelante. As condições de extração ótimas foram na razão de 0,18:1 surfactante-biomassa seca, razão de 0,08:1 quelante-biomassa seca. Sob tais condições, a pureza foi de 98,7%, taxa de recuperação de 93,3% e massa molar 3,1.10<sup>5</sup> dalton, sendo a massa molar original de 4.10<sup>5</sup> dalton. Apesar

do método de surfactante e quelante apresentarem operação conveniente, aliado à alta qualidade do produto, um problema constatado foi o grande volume de líquido residual produzido durante a extração.

Devido às recentes vantagens na tecnologia de fermentações para a produção de P(3HB), densidades celulares mais altas que 100 g.célula seca.L<sup>-1</sup> podem ser desenvolvidas. Por isso, um método para a recuperação de culturas com alta densidade celular foi desenvolvido por Kim et al., (2003), consistindo em um método direto de digestão SDS (Dodecil Sulfato de Sódio), com adição direta de SDS na cultura, agitação, tratamento com calor e passos de lavagem. A recuperação do P(3HB) obtida foi de 90%.

Um trabalho mais recente em relação à recuperação de P(3HB) por *C. necator* foi desenvolvido por Kapritchoff et al. (2005), que testaram diferentes enzimas para a recuperação e purificação do biopolímero, o melhor resultado obtido foi utilizando pancreatina a 50°C e pH de 9,0, com obtenção de 90% de P(3HB) puro. O Quadro 4 apresenta diferentes métodos de recuperação do PHB intracelular de bactérias, apontando suas vantagens e desvantagens.

**QUADRO 4 – MÉTODOS DE RECUPERAÇÃO DO PHB (FONTE: JACQUEL ET AL., 2005).**

MÉTODO DE RECUPERAÇÃO	VANTAGENS	DESvantagens	PUREZA (% P/P)
Extração com solvente	Não degradação do polímero / Elevada pureza	Alto custo	99,5
Digestão com surfactantes	Não degradação do polímero	Baixa pureza	95,0
Digestão com NaOCl	Elevada pureza	Degradação do polímero	99,0
Digestão com surfactantes e NaOCl	Baixo custo / alta pureza	Grande volume de efluentes líquidos	99,2
Digestão enzimática	Baixo impacto ambiental	Alto custo / Baixa pureza	93,0
Homogeneização	Ausência de produtos químicos	Degradação do polímero / Baixa pureza	95,0
Extração supercrítica com CO <sub>2</sub>	Baixo impacto ambiental	Baixa recuperação / Alto custo	98,0

## 2.6. O USO DO GLICEROL COMO SUBSTRATO

Um fator importante para a definição de um bioprocesso é a fonte de carbono a ser utilizada, pois o custo da fonte de carbono está sujeito a grandes variações. A redução dos custos de produção através do emprego de substratos de baixo custo foi abordada por vários autores na literatura. Esses substratos geralmente são resíduos da indústria de alimentos ou da agroindústria, conforme pode ser observado no Quadro 5.

QUADRO 5 – PRODUÇÃO DE PHAs A PARTIR DE FONTES DE CARBONO DE BAIXO CUSTO.

Microorganismo	Resíduo	Biopolímero	Referência
<i>C. necator</i>	Hidrolisado de tapioca	P(3HB)	Lee (1996), Choi e Lee (1999)
<i>K. aerogenes</i>	Melaço		
<i>E. coli</i> recombinante	Soro de queijo		
<i>A. chroococcum</i>	Amido		
<i>Actinomicetos</i>	Amido, glicerol, lactose, pectina	scl-PHA	Matias et al. (2005)
<i>C. necator</i>	Triglicerídeos	P(3HB)	Delgado et al. (2005)
<i>A. latus</i>			
<i>B. cepacia</i>			
<i>A. latus</i>	Malte, vinagre, soja, leite, confeitos	P(3HB)	Wong et al. (1999)
<i>S. epidermidis</i>			
<i>P. oleovorans</i>	Glicerol cru	P(3HB)	Ashby et al. (2005)
<i>P. corrugata</i>			
<i>C. necator</i>	Ácidos orgânicos	P(3HB-co-HV)	Yu (2001)
<i>C. necator</i>	Glicerol	P(3HB)	Taidi et al. (1994)

Uma vez encontrado um microorganismo produtor capaz de crescer e acumular biopolímeros a partir desses resíduos, não só é possível otimizar o processo (reduzindo o custo do biopolímero), como também é possível agregar valor a um material que antes tinha destino incerto e potencial para ser um agente poluidor no meio ambiente.

Um resíduo da agroindústria que vem ganhando destaque atualmente é o glicerol, um subproduto da produção do biodiesel (Figura 10), produzido aproximadamente na proporção de 9% em massa em relação ao biodiesel (Mascarenhas, 2005).

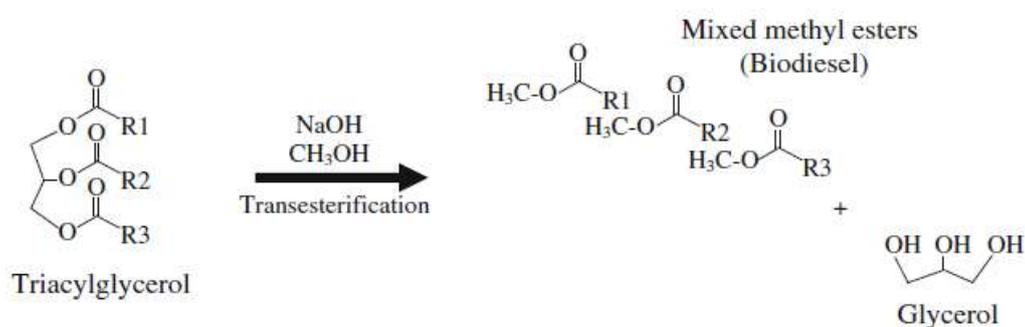


FIGURA 10 – REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO ENVOLVIDA NA PRODUÇÃO DE BODIESEL (FONTE: ASHBY ET AL., 2011).

O biodiesel é menos poluente que o diesel, tendo em vista que o gás carbônico gerado em sua queima volta a ser absorvido pelas plantas que serão utilizadas para produzir novamente o combustível (Mascarenhas, 2005). O biodiesel forma um ciclo fechado similar ao apresentado para o PHAs. Além disso, Knothe et al. (2005) apontam outras distinções do biodiesel, como a biodegradabilidade, a redução nas emissões (com exceção do óxido de nitrogênio), o alto ponto de ignição (estocagem mais segura) e a boa lubricidade. O fato de que o biodiesel pode ser misturado ao diesel gera a demanda necessária para iniciar sua produção, além de proporcionar parcialmente as vantagens já citadas.

Apesar da rota metílica para produção do biodiesel já estar bem estabelecida, ela apresenta os inconvenientes da toxicidade do metanol, que acaba tornando os resíduos tóxicos para usos posteriores. Além disso, esta rota não gera um ciclo auto-sustentável, pois o metanol geralmente é obtido de fontes fósseis. Adicionalmente, no caso do Brasil, o metanol tem de ser importado. Por outro lado, a rota etílica que está sendo desenvolvida no país é amparada pela ampla disponibilidade desse álcool, obtido a partir de fontes renováveis. Além disso, o etanol não apresenta toxicidade.

No presente momento, o glicerol, subproduto da produção do biodiesel, ainda tem mercado certo na síntese de resinas (ésteres), aplicações farmacêuticas, uso em cosméticos e em alimentos, com um consumo estimado em 30-40 mil toneladas por ano (kta) (Knothe et al., 2005). No entanto, com aumento da produção de biodiesel, o glicerol também passará a ser uma *commodity* e, muito provavelmente, virá a ser considerado um resíduo, pois o mesmo não será consumido na mesma proporção que o biodiesel. Levando-se em conta as políticas de desenvolvimento adotadas pelo governo brasileiro para o biodiesel, é possível afirmar que a produção do biodiesel aumentará muito nos próximos anos, tornando-se imprescindível encontrar alternativas para emprego do glicerol como matéria-prima de processos industriais. Atualmente a produção de glicerol, tomando como base a produção de biodiesel reportada por Ardenghy (2006), é de cerca de 100 kta, o que atende a uma adição de 2% de biodiesel no diesel convencional (conhecido como diesel B2). No entanto, o governo pretende acelerar a entrada no mercado da versão B5 do combustível, o que levaria a um aumento considerável da produção de biodiesel e como consequência do glicerol. Antes que o glicerol venha a se tornar um problema ambiental, torna-se necessário buscar alternativas para o seu emprego. Nesse contexto, uma alternativa para o seu uso é a produção de biopolímeros, uma vez que já foram identificados microorganismos capazes de crescer e acumular polímero usando o glicerol como única fonte de carbono. Alguns autores já começaram a publicar seus resultados, mostrando a viabilidade de produzir PHAs a partir do glicerol ou

da própria corrente rica em glicerol oriunda do processo de produção de biodiesel.

No Brasil produz-se PHAs (Biocycle, Usina da Pedra, Serrana / SP), associando a produção do biopolímero a um engenho de açúcar, que agrega valor ao açúcar produzido e ao mesmo tempo produz um polímero com preço mais competitivo (Nonato et al., 2001). Essa iniciativa mostra que é viável implementar a produção de PHAs associada à agroindústria a partir de um produto comercializável. Parece ser economicamente viável usar um resíduo como o glicerol para esse fim.

Um dos desafios na produção de PHAs é o controle das propriedades físicas do polímero formado, tais como o alargamento da distribuição de massas molares e a redução da massa molar média. Taidi et al. (1994) testou várias fontes de carbono em cultivos de *C. necator* e *Methylobacterium extorquens*, relatando a redução da massa molar do polímero produzido por *C. necator*, quando esta foi alimentada unicamente com glicerol. No entanto, nessa época o glicerol não era um resíduo, sendo obtido a partir do propeno em rotas petroquímicas.

Koller et al. (2005) utiliza um microorganismo osmofílico capaz de consumir glicerol como fonte de carbono para o crescimento celular e o acúmulo de polímero. Nos dados apresentados, a bactéria conseguiu acumular 76% em massa de polímero ao longo das 168 horas de cultivo. Pode ser observada uma etapa de crescimento celular, associada com a produção de biopolímero, e depois uma etapa limitada em crescimento, com acúmulo de polímero. A máxima velocidade específica de crescimento reportada foi de  $0,06 \text{ h}^{-1}$ , enquanto que o rendimento da fonte de carbono em polímero foi de  $0,23 \text{ g/g}$ .

Ashby et al. (2005) empregou as bactérias *P. oleovorans* e *P. corrugata* para converter uma corrente rica em glicerol em PHAs, no caso uma mistura de P(3HB) e PHAs de cadeia média (mcl-PHAs). A capacidade dessas bactérias em utilizar triglicerídeos (óleos vegetais e animais) e ésteres alquílicos, também presentes nessa corrente, para a produção dos PHAs as tornam boas escolhas para uso no reaproveitamento dessa corrente.

## CAPÍTULO III – METODOLOGIA

---

O processo de produção de PHB foi dividido em duas sequências de operações distintas: a etapa de fermentação e a etapa de recuperação e purificação do biopolímero.

Os dados experimentais e as condições operacionais foram obtidos a partir de artigos científicos indexados em periódicos. Utilizou-se como única fonte de carbono o glicerol purificado, pois a presença de sais no meio de fermentação é reportada frequentemente como um inibidor da biossíntese de PHA (Ashby et al., 2011).

### 3.1. SOFTWARE

Foi utilizado o software *SuperPro Designer*® v. 5.1, para a simulação do processo de produção de PHB proposto neste trabalho. Este programa realiza os balanços de massa e energia relacionados a cada equipamento do processo,

através da inserção de variáveis operacionais pertinentes a cada uma das operações unitárias. Fornece ainda relatórios com os dados de projeto dos equipamentos e realiza análise de ciclos de processos em batelada.

Quando inseridos os dados referentes aos custos da matéria-prima, dos insumos e utilidades, dos equipamentos, dos recursos humanos e dos tratamentos de efluentes líquidos, resíduos sólidos e emissões, o programa fornece relatórios de análises de custos e viabilidade econômica.

Este software pode ser utilizado para simular e otimizar plantas de uma grande gama de indústrias, como a farmacêutica, química fina, biotecnologia, tratamento de água, etc. Ele é uma valiosa ferramenta para engenheiros e cientistas no desenvolvimento de processos, incluindo processos em regime de batelada. Empresas que utilizam o programa em suas atividades de pesquisa e engenharia são: Bayer Technology Services (Europa e EUA), Bio-Springer (França), Cangene (Canada), Chugai Pharmaceuticals (Japão), Colgate Palmolive, Dow Chemical, DuPont, FMC BioPolymer, GlaxoSmithKline, Human Genome Sciences, Merck, Monsanto, Novartis, Petrobras, Pfizer, Procter & Gamble, entre outras.

### **3.2. MICROORGANISMO**

O microorganismo escolhido, a espécie *Cupriavidus necator*, é uma das que apresenta melhores condições à produção industrial. Este microorganismo destaca-se pela possibilidade de acumular mais de 80 % p/p de sua massa seca em polímero, com alta massa molar e utilizando diferentes tipos de substratos como glicose, frutose, glicerol dentre outros (Ramsay, 1994). No caso deste trabalho, considerou-se um acúmulo de 70% p/p de PHB na massa seca de células, baseado em Shen et al. (2009).

*Cupriavidus necator*, é um microorganismo procariótico, Gram-negativo, encontrado naturalmente no solo e na água. Possui células na forma de bastonete

com dimensões de 0,5 µm por 1,8 a 2,6 µm. É móvel, possuindo de 1 a 4 flagelos peritriquiaes. Na fase estacionária de crescimento, ou seja, no acúmulo de polímero, as células podem se tornar esféricas (Braunegg et al., 1998).

Sua temperatura ótima de crescimento é 34°C. Pode crescer autotroficamente em atmosfera de gases contendo H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. O pH na cultura de *R. eutropha* (atualmente conhecida como *C. necator*) geralmente decresce devido à produção de subprodutos no ciclo de Krebs. Um pH ótimo para o crescimento e produção de P(3HB) é aproximadamente 6,9, sendo que em pH de 5,4 há inibição no crescimento (Tanaka et al., 1994).

### 3.3. ETAPA DE FERMENTAÇÃO

A etapa de conversão do glicerol em PHB acontece em um biorreator, em condições específicas para otimizar a formação do produto. Para o caso do microorganismo *C. necator*, tem-se que as condições ótimas para a fermentação são:

<b>Temperatura</b>	34 °C
<b>pH</b>	7,0
<b>Aeração</b>	0,5 v.v.m.
<b>Agitação</b>	1,0 kW/m <sup>3</sup>

O software SuperPro Designer possibilita a simulação de um processo fermentativo baseada em uma equação que descreva o consumo dos reagentes e a formação de produtos. Dessa forma, precisa-se conhecer a composição centesimal da bactéria *C. necator*, para determinar sua massa molar. Foi utilizada como fonte Yamane et al. (1996), que relata a utilização de uma bactéria com características similares, a *A. latus*.

O Quadros 6 e 7 relacionam os reagentes e os produtos, com suas respectivas fórmulas moleculares e massas molares.

QUADRO 6 – REAGENTES NA ESTEQUIOMETRIA DA FERMENTAÇÃO (FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA).

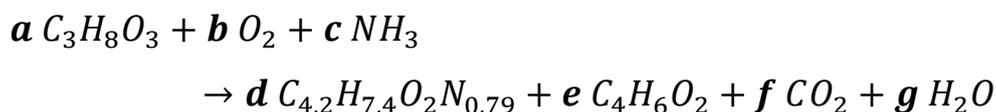
REAGENTES	FÓRMULA MOLECULAR	MASSA MOLAR (g/mol)
Glicerol	$C_3H_8O_3$	92,10
Oxigênio	$O_2$	32,00
Amônia	$NH_3$	17,03

QUADRO 7 – PRODUTOS NA ESTEQUIOMETRIA DA FERMENTAÇÃO (FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA).

PRODUTOS	FÓRMULA MOLECULAR	MASSA MOLAR (g/mol)
<i>C. necator</i>	$C_{4,2}H_{7,4}O_2N_{0,79}$	100,86
3-hidroxiacetato	$C_4H_6O_2$	86,09
Gas carbônico	$CO_2$	44,01
Água	$H_2O$	18,02

A bactéria utiliza o glicerol como fonte de carbono, a amônia (sulfato de amônio) como fonte de nitrogênio e o  $O_2$ , por sua atividade ser aeróbia. Como produto, temos a formação de biomassa, onde o 3HB – o monômero do PHB – encontra-se em forma de grânulos no interior das células de *C. necator*. Formam-se ainda gás carbônico e água.

Portanto a equação pertinente é:



onde tem-se 7 coeficientes a serem determinados.

Realiza-se um balanço de elementos químicos, objetivando buscar equações para determinar os coeficientes estequiométricos.

$$C: 3a = 4,2d + 4e + f$$

$$H: 8a + 3c = 7,4d + 6e + 2g$$

$$N: 1c = 0,79d$$

$$O: 3a + 2b = 2d + 2e + 2f + g$$

Neste ponto, tem-se 4 equações e 7 incógnitas. Pode-se então diminuir um grau de liberdade do sistema, condicionando à formação de apenas 1 mol de célula. Ou seja,  $d = 1$ , e agora tem-se 5 equações, faltando apenas duas para a determinação do sistema linear.

Com base em dados experimentais (Cavalheiro et al., 2009 ; Solaiman et al., 2006 ; Koller et al., 2005 ; Yazdani et al., 2007), pode-se desenvolver as 2 equações restantes. Esses parâmetros da fermentação são o rendimento de glicerol em PHB e o percentual de PHB em massa seca de célula, e estão apresentados a seguir com seus respectivos valores.

$$Y_{\text{PHB/glicerol}} = 0,4 \text{ g/g}$$

*70% de PHB em biomassa seca*

Como se está trabalhando com coeficientes molares, calcula-se, a partir do rendimento em massa de glicerol em PHB, o rendimento em mol de glicerol em PHB.

$$Y_{\text{PHB/glicerol}} = 0,428 \text{ mol/mol}$$

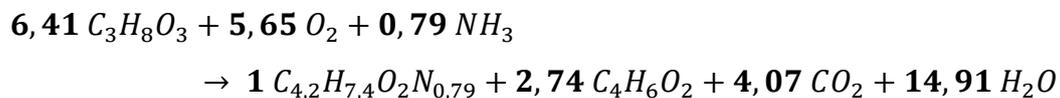
E com este parâmetro tem-se uma nova equação:  $a = 2,34 e$

A última equação obtém-se a partir da relação do percentual em PHB em biomassa seca, de onde determina-se diretamente o valor do coeficiente estequiométrico para o 3HB (coeficiente e).

$$0,7 * (d * MM_{\text{célula}} + e * MM_{3\text{HB}}) = e * MM_{3\text{HB}}$$

$$e = 2,74$$

Com isso determina-se os valores de todos os coeficientes estequiométricos da equação proposta, como pode ser observado a seguir.



Essa reação é então inserida no biorreator, de modo que o programa realize o balanço de massa no equipamento e forneça os dados de projeto pertinentes.

### 3.4. PROCESSO DE RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO

Ao sair da seção de fermentação, a corrente vai para a seção de recuperação e purificação, visando obter um produto final com alto teor de pureza. As etapas que farão parte desse processo foram escolhidas tomando como base um levantamento a partir de artigos (Cavalheiro et al., 2009 ; Solaiman et al., 2006 ; Koller et al., 2005 ; Yazdani et al., 2007), onde as principais variáveis consideradas foram o teor de pureza do PHB na corrente final, e os custos associados às operações unitárias e aos reagentes utilizados relatados.

A metodologia escolhida para a recuperação do PHB intracelular foi a digestão química do material celular não-PHB, com hipoclorito de sódio, devido ao seu forte poder oxidante. A adição de um surfactante (Dodecil Sulfato de Sódio-SDS) para promover a solubilização do material celular não-PHB, principalmente o material presente na membrana celular, aumenta a eficiência deste processo, como descrito por Posada et al. (2010). Antes da etapa de recuperação propriamente dita, realiza-se um pré-tratamento alcalino e térmico na corrente efluente do biorreator, com o objetivo principal de desnaturar algumas proteínas da membrana celular e os ácidos nucleicos. Esta estratégia foi adotada baseando-se em Posada et al. (2010).

Segundo Posada et al. (2010), a etapa de pré-tratamento alcalino e térmico propicia uma maior pureza do produto final quando é realizada com solução de hidróxido de sódio 3,0 M, em uma razão mássica de NaOH/células de 0,4 e em uma temperatura de 50 °C. Esta etapa é realizada em um tanque de mistura.

Em seguida a corrente que deixa este tanque de mistura segue para uma centrífuga de discos, onde a solução é concentrada e grande parte da soda cáustica é eliminada na corrente menos densa efluente deste equipamento.

A corrente mais densa que deixa a centrífuga segue para um tanque de mistura onde ocorrerá a etapa de digestão propriamente dita. São adicionados à corrente rica em células uma solução de hipoclorito de sódio e uma solução do surfactante Dodecil Sulfato de Sódio, mais conhecido como SDS. Nesta etapa, as células perdem suas características de uma unidade própria, devido ao rompimento da membrana e solubilização do material celular não-PHB. Estes resíduos de células, agora solubilizados, são conhecidos como “debris” e serão separados da corrente principal, agora rica em PHB, em uma nova etapa de centrifugação realizada em seguida.

De acordo com Cavalheiro et al. (2009), para se obter uma maior eficiência na etapa de digestão celular, deve-se manter o tanque de mistura a temperatura de 55 °C durante 20 minutos, contados a partir da adição da solução de hipoclorito e de SDS. Ainda segundo Cavalheiro et al. (2009), para a obtenção de uma alta eficiência a razão mássica NaOCl/células deve ser igual a 1/3, enquanto a razão mássica SDS/células deve ser igual a 0,18. Essas condições também permitem que seja evitada a redução da massa molar das moléculas de PHB presentes.

Em uma próxima etapa, a corrente mais densa efluente da centrífuga vai para um novo tanque de mistura onde é adicionada uma solução de lavagem, contendo peróxido de hidrogênio 4,7% p/p.

Em seguida, a corrente que deixa este último tanque de mistura segue para uma nova centrífuga, onde ocorrerá uma concentração final da solução rica em

PHB e separação do Peróxido de Hidrogênio e outros reagentes que por ventura ainda estejam presentes.

Em uma última etapa, a corrente, já com uma elevada concentração de PHB, vai para uma operação de secagem conhecida como “spray dryer”. Neste equipamento, uma corrente de ar aquecido ascendente passa através da “lama” rica em PHB descendente, promovendo a atomização da alimentação e a evaporação de substâncias voláteis. Este tipo de secagem produz esferas relativamente uniformes apresentando a mesma proporção de compostos não-voláteis presente na alimentação. O produto final obtido é o PHB em forma de pó, com elevado teor de pureza (Figura 11).



FIGURA 11 – PHB OBTIDO EM FORMA DE PÓ AO FINAL DO PROCESSO DE SECAGEM, PELA EMPRESA BIOCYCLE® (FONTE: [HTTP://WWW.BIOCYCLE.COM.BR/](http://www.biocycle.com.br/))

## **CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

A simulação da planta de produção de PHB utilizando glicerol como fonte de carbono foi realizada utilizando as operações descritas no capítulo anterior. Os dados gerados pelo software foram coletados de trabalhos e analisados e serão apresentados e discutidos neste capítulo.

### **4.1. FLUXOGRAMA DO PROCESSO**

Uma planta industrial de produção de PHB utilizando o glicerol como fonte de carbono consiste em uma sequência de operações, que podem ser observadas na Figura 12, obtida através da simulação com software SuperPro Designer v. 5.1.

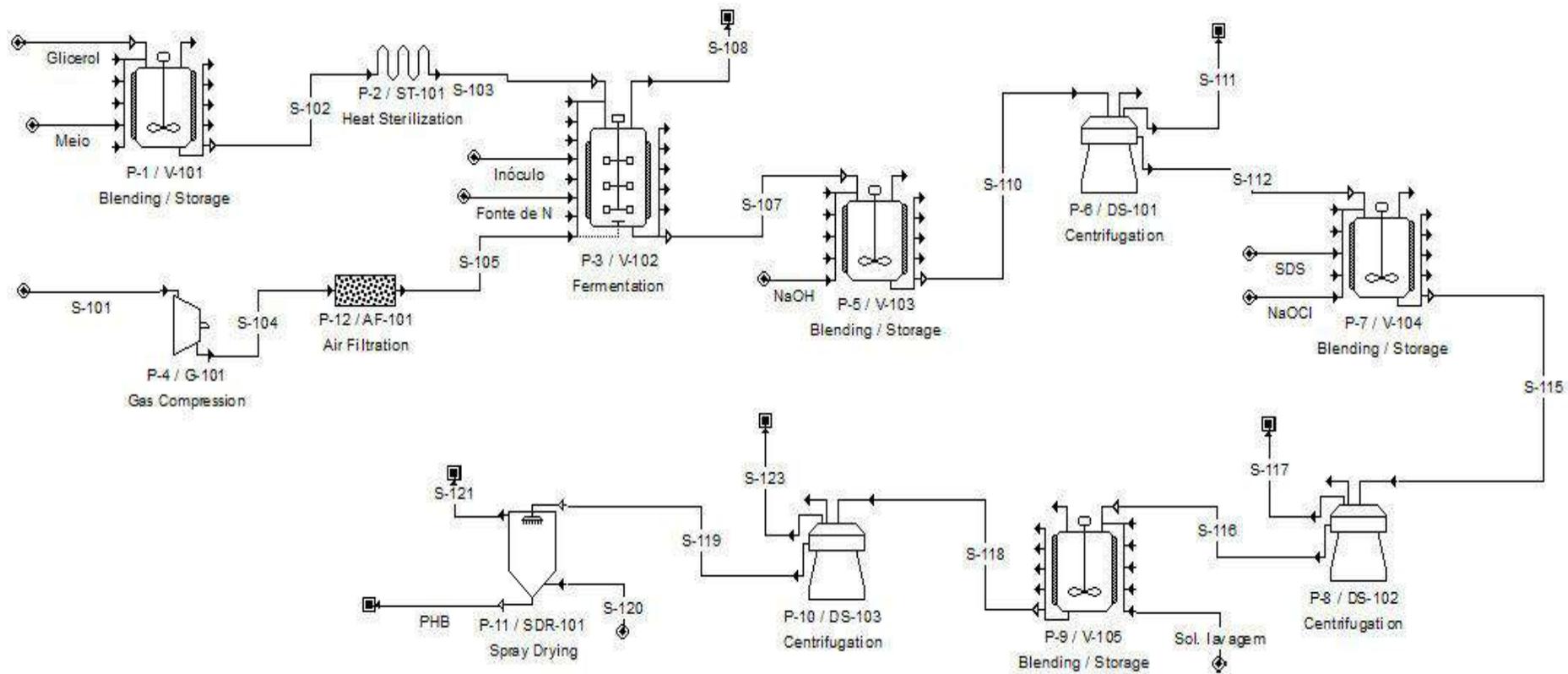


FIGURA 12 – FLUXOGRAMA DE UMA PLANTA DE PRODUÇÃO DE PHB UTILIZANDO GLICEROL COMO FONTE DE CARBONO (FONTE: SUPERPRO DESIGNER V.5.1).

## **4.2. BALANÇOS DE MASSA E DADOS DE PROJETO DOS EQUIPAMENTOS**

Neste subcapítulo são apresentados os balanços de massa referentes à cada equipamento presente na planta simulada neste trabalho. Os balanços são estabelecidos a partir da composição e vazão mássica nas correntes de entrada e saída de cada operação. Ao rodar a simulação, o software fornece os dados de projeto de cada um dos equipamentos, que também são apresentados neste subcapítulo.

### **4.2.1. BIORREATOR**

É no biorreator que ocorrem as reações de transformação biológica da matéria-prima do processo, o glicerol, em produtos. Dentre eles, incluem as células e o biopolímero de interesse, o PHB, que é formado no interior destas. A etapa de fermentação pode ser dividida em duas partes, uma de crescimento celular, e outra de acúmulo de PHB, induzido pela interrupção do fornecimento de fonte de nitrogênio para a bactéria. Embora, no contexto da simulação realizada, considera-se a fermentação como uma reação química realizada em apenas uma etapa.

Considerou-se, baseado em Posada et al. (2011) e Cavalheiro et al. (2009), uma etapa de crescimento celular com duração de 20 horas, onde o fornecimento de nitrogênio deu-se através de uma alimentação contínua de sulfato de amônio no biorreator. Transcorridas as 20 horas iniciais, esta alimentação foi interrompida, iniciando-se a fase de acúmulo do biopolímero, onde tem-se um valor de biomassa residual constante, ou seja, o crescimento celular se dá apenas devido à formação dos grânulos de PHB.

Foram inseridas as condições para a fermentação, de acordo com valores obtidos diversos artigos científicos citados anteriormente. Assim, o software forneceu os resultados do projeto do biorreator e o balanço de massa referente à etapa de fermentação. Estes dados encontram-se expostos nas Tabelas 1 e 2.

De acordo com a Tabela 2, foi introduzida no biorreator uma corrente contendo 3090 kg de alimentação originando um produto com 3025 kg de biomassa e 22626 kg de gases gerados pela fermentação. Desta maneira, o rendimento obtido nesta etapa foi de 57% p/p de conversão de glicerol em células.

TABELA 1 – DADOS DE PROJETO DO BIORREATOR.

VOLUME	3,80 m <sup>3</sup>
ALTURA	3,53 m
DIÂMETRO	1,17 m



FIGURA 13 – BIORREATOR UTILIZADO PARA PRODUÇÃO DE PHB NA BIOCICLE®  
(FONTE: WWW.BIOCICLE.COM)

TABELA 2 – BALANÇO DE MASSA NO BIORREATOR.

BIORREATOR	ENTRADA (kg)	SAÍDA (kg)
Glicerol (98% p/p)	1000	
Água	2000	
Sulfato de amônia	75	
Ar	22561	
Inóculo	15	
Corrente (18,5% p/p biomassa)		3025
Emissões		22626

#### 4.2.2. TANQUE DE MISTURA 1

Nesta etapa ocorre um pré-tratamento alcalino da solução proveniente do biorreator, visando uma alteração brusca de seu pH, iniciando o processo de lise celular e preparando as células para as etapas seguintes de digestão. Assim, foi adicionada nesta corrente, uma solução de Hidróxido de Sódio (3,0 M), em uma razão de 0,4 entre a massa de NaOH e a massa de células. Na Tabela 3 estão descritos os dados de projeto deste equipamento.

Como pode ser observado na Tabela 4, foi adicionada ao tanque de mistura, contendo a corrente efluente do biorreator, uma solução de soda 3,0 M com 1900 kg. Ao final desta etapa obteve-se uma massa efluente do tanque de 4925 kg.

TABELA 3 – DADOS DE PROJETO DO TANQUE DE MISTURA 1.

VOLUME	5,38 m <sup>3</sup>
ALTURA	3,93 m
DIÂMETRO	1,32 m

TABELA 4 – BALANÇO DE MASSA NO TANQUE DE MISTURA 1.

TANQUE DE MISTURA 1	ENTRADA (kg)	SAÍDA (kg)
Corrente (18,5% biomassa)	3025	
NaOH (3M)	1900	
Corrente (11,3% biomassa)		4925

#### 4.2.3. CENTRÍFUGA 1

Este estágio compreende a separação da fase mais densa da fase menos densa provocada pela rotação. Assim, durante a centrifugação, as fases com diferentes densidades se separam, por ação da força centrífuga, originando um sobrenadante com menor concentração de sólidos. A Figura 14 ilustra o tipo de centrífuga usado no processo.

Sendo assim, a corrente oriunda do tanque de mistura 1, apresentando uma massa de 4925 kg, foi centrifugada durante 20 minutos. No término desta etapa, obteve-se um sobrenadante constituído, principalmente, de NaOH diluído, totalizando uma massa de 3536 kg e uma suspensão contendo 1389 kg, sendo 40,2% desse valor correspondente à massa celular. Diante dos dados expostos, percebe-se que houve uma concentração da corrente principal, que antes da operação tinha uma teor de 11,3% em massa de biomassa e passou a apresentar uma teor de 40,2%. A Tabela 5 apresenta os valores das correntes de entrada e saída da centrífuga.

TABELA 5 – BALANÇO DE MASSA NA CENTRÍFUGA 1.

CENTRÍFUGA 1	ENTRADA (kg)	SAÍDA (kg)
Corrente (11,3% biomassa)	4925	
Efluente líquido (soda diluída)		3536
Corrente (40,2% biomassa)		1389

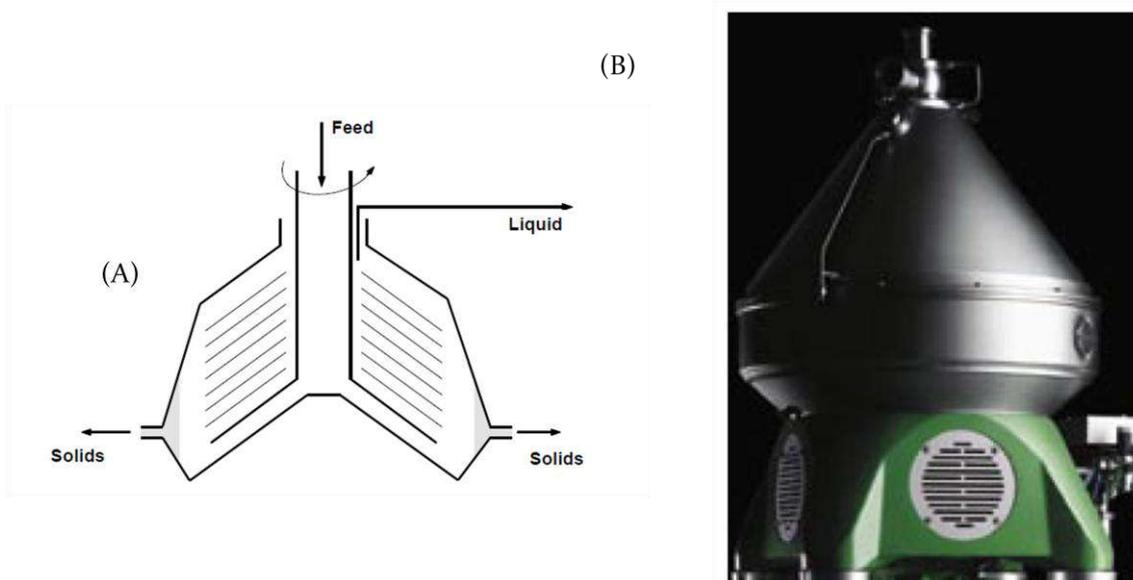


FIGURA 14 – (A) REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO INTERIOR DE UMA CENTRÍFUGA DE DISCOS; (B) EXEMPLO DE UMA CENTRÍFUGA DE DISCOS INDUSTRIAL USADA EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS (FONTE: WWW.WESTFALIA-SEPARATOR.COM).

#### 4.2.4. TANQUE DE MISTURA 2

O PHB é um polímero produzido no interior das células e, assim, são necessárias etapas subsequentes de digestão para a sua recuperação. É no tanque de mistura 2 que este processo inicia. Isto é feito adicionando na corrente de efluente da centrifugação (que contém a biomassa), uma solução de NaOCl e uma solução de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio). O primeiro realiza a digestão do material celular não-PHB, devido ao seu forte caráter oxidante, e o segundo promove a solubilização deste material celular não-PHB, devido às suas características tensoativas.

Foram, então, inseridos 100 kg de SDS e 780 kg de solução de NaOCl (36% p/p) à corrente de biomassa, que foram misturados durante 76 minutos. Esta fase gerou uma corrente de saída de 2268,5 kg, com uma concentração de 17,3% em massa de PHB, e resíduos. Os dados de dimensionamento deste equipamento, bem como o balanço de massa referente à esta operação, estão dispostos na Tabela 6 e 7.

**TABELA 6 – DADOS DE PROJETO DO TANQUE DE MISTURA 2.**

<b>VOLUME</b>	2,50 m <sup>3</sup>
<b>ALTURA</b>	3,06 m
<b>DIÂMETRO</b>	1,02 m

**TABELA 7 – BALANÇO DE MASSA NO TANQUE DE MISTURA 2.**

<b>TANQUE DE MISTURA 2</b>	<b>ENTRADA (kg)</b>	<b>SAÍDA (kg)</b>
Corrente (40,2% biomassa)	1389	
SDS	100,5	
NaOCl (36% p/p)	780	
Corrente (17,3% PHB)		2268,5

#### 4.2.5. CENTRÍFUGA 2

Conforme dito anteriormente, a centrifugação é utilizada para separar partículas mais densas que estejam em solução por meio de rotação do sistema. Nesta etapa, ocorre a segregação do PHB, ficando na fase menos densa todo o material celular não-PHB, que encontra-se digerido e solubilizado. Na Tabela 8 pode-se observar o balanço de massa resultante deste processo.

**TABELA 8 – BALANÇO DE MASSA NA CENTRÍFUGA 2.**

<b>CENTRÍFUGA 2</b>	<b>ENTRADA (kg)</b>	<b>SAÍDA (kg)</b>
Corrente (17,3% PHB)	2268,5	
Corrente (32,9% PHB)		1189,3
Efluente líquido (rico em debris)		1079,2

A corrente efluente do tanque de mistura 2 com massa de 2268,5 kg, após passar pela centrifugação durante 20 minutos, gerou duas correntes: uma de efluente líquido, rico em debrís (material celular digerido), SDS, NaOCl, com massa de 1079,2 kg e outra de solução mais densa, contendo 1189,3 kg de massa de PHB. Esta fase promoveu a concentração de 17,3% em massa para 32,9% em massa de PHB.

#### 4.2.6. TANQUE DE MISTURA 3

A corrente contendo o biopolímero proveniente da centrífuga 2 alimenta o tanque de mistura 3. É neste equipamento que é adicionado à corrente principal 100 Kg de uma solução de Peróxido de Hidrogênio com concentração de 4,7% em peso, para promover uma lavagem da suspensão. Esta etapa tem duração de 30 minutos e obtém-se uma corrente de saída com 1289,3 kg de concentração de 30,2% em massa de PHB, estes valores podem ser conferidos na Tabela 10 que segue.

A Tabela 9 mostra os dados de volume, altura e diâmetro, referentes ao dimensionamento do tanque de mistura utilizado nesta operação. E a Tabela 10 apresenta o balanço de massa na operação de lavagem.

TABELA 9 – DADOS DE PROJETO DO TANQUE DE MISTURA 3.

<b>VOLUME</b>	1,46 m <sup>3</sup>
<b>ALTURA</b>	2,57 m
<b>DIÂMETRO</b>	0,85 m

TABELA 10 – BALANÇO DE MASSA NO TANQUE DE MISTURA 3.

TANQUE DE MISTURA 3	ENTRADA (kg)	SAÍDA (kg)
Corrente (32,9% PHB)	1189,3	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (4,7% peso)	100	
Corrente (30,2% PHB)		1289,3

#### 4.2.7. CENTRÍFUGA 3

Nesta fase do processo é feita a terceira e última centrifugação para a obtenção de um produto purificado. A separação, assim como nas centrífugas anteriores, é realizada em um tempo de 20 minutos. Na entrada tem-se a corrente oriunda do tanque de mistura 3, de concentração de 30,2% em massa de PHB, e, ao final do processo, duas correntes de saída. Uma corrente líquida, com massa de 451,8 kg, constituída de compostos não-PHB solubilizados e outra corrente contendo o PHB em uma concentração de 46,6% em massa e um total de 837,5 kg.

TABELA 11 – BALANÇO DE MASSA NA CENTRÍFUGA 3.

CENTRÍFUGA 3	ENTRADA (kg)	SAÍDA (kg)
Corrente (30,2% p/p de PHB)	1289,3	
Efluente líquido “leve”		451,8
Corrente (46,6% p/p de PHB)		837,5

#### 4.2.8. SPRAY DRYER

O “Spray Dryer” é um equipamento que promove a conversão de uma suspensão em uma forma particulada seca pela sua aspensão através de uma

câmara, onde promove-se um contato com um agente de secagem aquecido, usualmente o ar. Sendo assim, lançou-se mão desta operação de forma a purificar o polímero. A corrente de PHB efluente da centrífuga 3, entra nesta etapa juntamente com 2209,4 kg de ar e, após 6 horas, o processo é finalizado. Na saída, obtém-se uma corrente de efluente com 2651,2 kg de massa e uma corrente de PHB com 98,9% p/p em massa e 395,7 kg.

Diante destes valores, verifica-se que o processo originou um produto de alta pureza, em forma de pequenas partículas sólidas. Este material posteriormente pode passar por uma etapa de extrusão originando produtos na forma de pellets.

Os dados de projeto do “spray dryer” utilizado na planta simulada encontram-se na Tabela 12. Na Tabela 13 pode-se ver o balanço de massa neste equipamento. A Figura 15 ilustra um típico “spray dryer”.

**TABELA 12 – DADOS DE PROJETO DO “SPRAY DRYER”.**

<b>DIÂMETRO</b>	0,68 m
<b>ALTURA</b>	2,04 m

**TABELA 13 – BALANÇO DE MASSA NO “SPRAY DRYER”.**

<b>SPRAY DRYER</b>	<b>ENTRADA (kg)</b>	<b>SAÍDA (kg)</b>
Corrente (46,6% p/p PHB)	837,5	
Ar	2209,4	
Efluente		2651,2
Corrente (98,9% p/p PHB)		395,7



FIGURA 15 – EXEMPLO DE UM “SPRAY DRYER” (FONTE: CHANGZHOU HENGCHENG FIRST DRYING EQUIPMENT CO., LTD.).

#### 4.3. ANÁLISE DA PRODUTIVIDADE E DO CONSUMO DE UTILIDADES

No processo de produção de poli-3-hidroxibutirato, a etapa de fermentação é a que determina o seu tempo global por ser a etapa mais longa, com 42 horas. Desse tempo, 40 horas são referentes à fermentação propriamente dita e as duas horas restantes são equivalentes ao tempo de transferência para o tanque de mistura 1, mais o tempo de limpeza do biorreator.

O tempo total de uma batelada é de aproximadamente 51 horas, sendo que os ciclos posteriores à primeira batelada duram 43 horas. Esta diferença ocorre pois assim que o produto da fermentação deixa o biorreator, e este é limpo, a alimentação de glicerol é retomada, dando início a um novo ciclo. Este fato é apresentado na Figura 16.

Outro processo que demanda um tempo considerável é o “spray dry”. Esta operação necessita de 6 horas de duração para processar – atomizar e secar – a corrente que deixa a centrífuga 3.

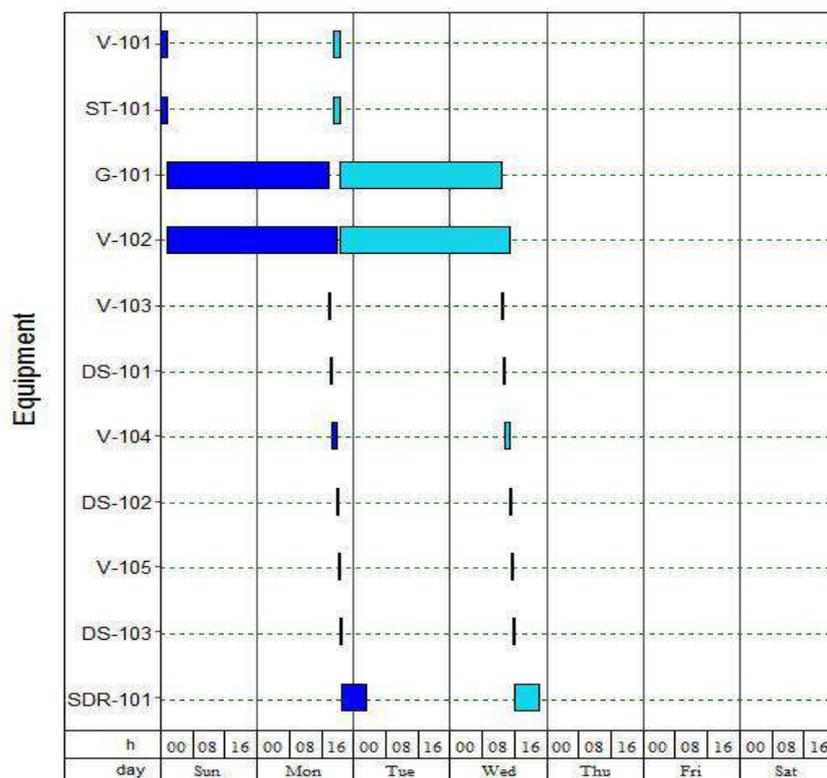


FIGURA 16 – GRÁFICO DO TEMPO DE OPERAÇÃO POR EQUIPAMENTO, EM DUAS BATELADAS CONSECUTIVAS (FONTE: SUPERPRO DESIGNER V.5.1).

Assumindo um tempo de operação anual disponível de 7920 horas, é possível obter um total de 183 bateladas por ano. Sabendo que por batelada produz-se 395,7 kg de PHB, obtem-se, então, uma produtividade anual de 72407,3 kg de PHB, ou seja, aproximadamente 72,5 toneladas de PHB. Os dados gerais do processo encontram-se na Tabela 14.

TABELA 14 – DADOS GERAIS DO PROCESSO.

TEMPO DE OPERAÇÃO ANUAL	7877,1	horas
TAXA DE PRODUÇÃO ANUAL	72407,3	kg PHB / ano
TAXA DE PRODUÇÃO POR BATELADA	395,7	kg PHB / batelada
TEMPO DE BATELADA	51,1	horas
TEMPO DE CICLO	43,0	horas
NÚMERO DE BATELADAS POR ANO	183,0	bateladas / ano

Como o gargalo do processo é a etapa de fermentação, a utilização de um biorreator operando em paralelo ao já existente, ou seja, dois biorreatores trabalhando de forma que exista um intervalo de tempo entre o início da operação de cada um deles, é possível duplicar a produtividade anual deste processo, utilizando os equipamentos da etapa de recuperação e purificação sem necessitar de novos dimensionamentos. Deste modo, alcançaria-se uma produtividade anual de 145 toneladas de PHB. Este fato deve ser levado em consideração no projeto de plantas que operem processos biológicos, pois o custo adicional inicial e operacional de um novo biorreator é compensado pelo aumento substancial da produtividade.

As etapas de recuperação da planta simulada neste trabalho demandam uma grande quantidade de insumos, por se tratar de um processo químico de digestão celular. Entretanto, frente a outros métodos de recuperação, a atratividade deste processo se destaca pelo baixo custo desses reagentes, aliado ao elevado grau de pureza do produto final. Neste processo, ainda existe a vantagem da pouca redução de massa molecular do biopolímero obtido, um grande problema quando utiliza-se processos mecânicos para a recuperação.

O consumo total de matérias-primas e insumos por batelada é de 46.120 kg. Entretanto, apenas o consumo de ar, algo sem custo para a planta, desconsiderando sua compressão, corresponde a mais de 50% desse valor. Outra substância com consumo elevado é a água, o que pode ser uma desvantagem por gerar uma grande quantidade de efluentes líquidos. Isso aumenta o custo do processo por promover uma necessidade de tratamento destes efluentes.

O consumo das soluções de surfactante e de hipoclorito correspondem a 0,004% e 0,017%, respectivamente. Pelo fato do SDS não ter um baixo custo, ele deve ser recuperado para ser reciclado ao processo. Da mesma forma, o hipoclorito de sódio deve ser recuperado em uma unidade própria e reusado no processo, principalmente por ser uma substância halogenada, evitando o seu descarte no meio ambiente. Portanto, o acoplamento de uma unidade de

recuperação de NaOCl e de SDS à planta de produção de PHB, diminui o consumo global destes reagentes.

Na Tabela 15, pode-se observar o consumo específico em termos de PHB das matérias-primas e insumos usados no processo. Após a água, o ar e a solução de hidróxido de sódio, o maior consumo específico é do glicerol, a fonte de carbono para a fermentação. Isso mostra que a escolha da matéria-prima adequada é importante, pois tem um impacto direto na redução do custo global do processo. Como o glicerol é um subproduto da produção de biodiesel, e por isso tem um potencial de se tornar uma commodity, a tendência é que seu custo diminua com o passar do tempo. Ainda, observa-se que o glicerol terá seu valor agregado aumentado se sua finalidade for para a produção de PHB.

TABELA 15 – CONSUMO DE MATÉRIAS-PRIMAS E INSUMOS

MATÉRIAS-PRIMAS E INSUMOS	kg/ano	kg/batelada	kg/kg PHB
ÁGUA	3291996,5	17489	45,465
GLICEROL 98%	183000,0	1000	2,527
SULFATO DE AMÔNIO	13725,0	75	0,189
AR	4532998,6	24770	62,604
NaOH (3 M)	347700,0	1900	4,802
SDS	18300,0	100	0,253
NaOCl (36% p/p)	51240,0	780	0,708
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	915,0	5	0,013
<b>TOTAL</b>	<b>8.439.875,05</b>	<b>46.120</b>	<b>117</b>

Outros dados relevantes gerados pelo software são o consumo anual de energia elétrica, vapor, água de resfriamento e água refrigerada. Na Tabela 16, pode-se observar a quantidade anual de energia elétrica requerida, em kWh, em cada equipamento. A operação com maior demanda é a compressão do ar utilizado para a aeração no biorreator. Este fato é comum em plantas de processos químicos e bioquímicos, onde o custo operacional da compressão pode alcançar 50% do custo operacional total do processo. Baseando-se somente no

consumo de eletricidade, pode-se dizer que o compressor requer aproximadamente 80% do total gasto na planta anualmente.

Ainda na Tabela 16, pode-se observar que o consumo elétrico na centrífuga 1 é maior do que nas centrífugas 2 e 3, pelo simples fato da vazão afluyente na primeira ser maior do que nas demais. O consumo dos equipamentos não listados, que incluem as bombas presentes na planta e as utilidades, ficam à cargo da energia elétrica necessária para o fornecimento de luz no local, entre outras necessidades.

**TABELA 16 – CONSUMO ANUAL DE ENERGIA ELÉTRICA.**

<b>SIGLA</b>	<b>EQUIPAMENTO</b>	<b>QUANTIDADE ANUAL ( kWh )</b>
V-101	TANQUE DE DILUIÇÃO DO GLICEROL	86
V-102	BIORREATOR	20650
G-101	COMPRESSOR	310020
V-103	TANQUE DE MISTURA 1	148
DS-101	CENTRÍFUGA 1	21906
V-104	TANQUE DE MISTURA 2	103
DS-102	CENTRÍFUGA 2	8074
V-105	TANQUE DE MISTURA 3	40
DS-103	CENTRÍFUGA 3	4329
SDR-101	SPRAY DRYER	3065
EQUIPAMENTOS NÃO LISTADOS E UTILIDADES		23339
<b>TOTAL</b>		<b>391760</b>

A Tabela 17 apresenta o consumo anual de vapor requerido nas operações da planta. O “spray dryer” é o equipamento que mais demanda vapor, devido à necessidade de aquecimento do ar utilizado para a secagem da corrente rica em PHB que entra nele. A temperatura do ar deve estar em torno de 100 °C, de modo que todas as substâncias volatilizem e vão para o efluente gasoso, deixando apenas o PHB em forma de pó, com alto grau de pureza.

O esterilizador é o equipamento que requer a segunda maior quantidade de vapor para sua operação, como pode ser observado na Tabela 17. É fácil a compreensão deste elevado consumo, já que o processo de esterilização se baseia na passagem da corrente de matéria-prima por um tubo aquecido até que esta atinja a temperatura de 150 °C, e permaneça neste valor por um determinado intervalo de tempo, para que se atinja o critério de esterilização fixado.

Os demais equipamentos que demandam vapor são os tanques de mistura 1 e 2. As operações realizadas nestes tanques possuem uma temperatura que otimiza os processos de pré-tratamento alcalino e de digestão do material celular não-PHB.

TABELA 17 – CONSUMO ANUAL DE VAPOR.

SIGLA	EQUIPAMENTO	QUANTIDADE ANUAL (kg)
ST-101	ESTERILIZADOR	18755
V-103	TANQUE DE MISTURA 1	7368
V-104	TANQUE DE MISTURA 2	9390
SDR-101	SPRAY DRYER	161724
<b>TOTAL</b>		<b>197237</b>

A corrente que deixa o esterilizador deve ser resfriada para que se atinja a temperatura ótima de fermentação do glicerol pela bactéria *C. necator* antes de sua alimentação no biorreator, que é de 34°C. Para isso, utiliza-se um trocador de calor no qual o agente de resfriamento é a água corrente. Uma outra operação que exige o resfriamento de sua corrente de saída é o compressor. O ar, ao ser comprimido, tem sua temperatura elevada significativamente, devendo atingir 34°C antes que seja alimentado ao biorreator. O consumo anual de água para resfriamento nestes dois equipamentos é apresentado na Tabela 18.

TABELA 18 – CONSUMO ANUAL DE ÁGUA DE RESFRIAMENTO.

SIGLA	EQUIPAMENTO	CONSUMO ANUAL (ton)
ST-101	ESTERILIZADOR	2834
G-101	COMPRESSOR	27305
<b>TOTAL</b>		<b>30139</b>

A fermentação é um processo que exige extremo cuidado na manutenção da temperatura de operação, já que se trata de um processo biológico, e por isso sua eficiência é extremamente sensível à variações no ambiente. Como este é um processo exotérmico e sua temperatura deve ser mantida constante durante as 40 horas de operação, utiliza-se água refrigerada como agente de refrigeração. A principal diferença entre estes agentes é a temperatura em que se encontram inicialmente e a temperatura atingida ao final de seu uso. Enquanto a água corrente entra em um trocador de calor a 25 °C, a água refrigerada tem sua temperatura inicial igual a 5°C. Este fato permite que a troca térmica no biorreator, utilizando a água refrigerada, seja realizada mais rapidamente, já que a taxa de calor retirado é proporcional ao gradiente de temperatura, que será maior dessa forma. A Tabela 19 apresenta o consumo de água refrigerada utilizada para este fim.

**TABELA 19 – CONSUMO ANUAL DE ÁGUA REFRIGERADA.**

<b>SIGLA</b>	<b>EQUIPAMENTO</b>	<b>CONSUMO ANUAL (ton)</b>
V-102	BIORREATOR	3623

## CAPÍTULO V – CONCLUSÃO

---

O poli-3-hidroxi-butirato tem um potencial mercado, visando a substituição de polímeros de origem petroquímica, principalmente o polietileno e o polipropileno, devido às suas propriedades semelhantes. Todavia, sua oferta global ainda é pequena, por apresentar poucas plantas de produção distribuídas pelo mundo.

Seu custo final encontra-se atrelado à matéria-prima utilizada para a fermentação e à seleção correta das operações de recuperação e purificação do PHB. Atualmente, as plantas que operam em escala industrial e em escala piloto utilizam carboidratos como fonte de carbono, e geralmente estão alocadas próximas às usinas de processamento de cana-de-açúcar e milho, introduzindo o conceito de biorrefinaria. Neste contexto, o açúcar proveniente da cana ou do milho pode ter destinos diferentes, cada um atendendo a demanda de um determinado produto, o etanol ou o açúcar ou o PHB.

Este trabalho propôs uma planta em escala industrial de produção do biopolímero, utilizando o glicerol como fonte de carbono. Sua implantação deve

ser realizada próxima à plantas de produção de biodiesel para que, do mesmo modo que aquelas que utilizam carboidrato, seja mantido o conceito de biorrefinaria. Uma vantagem deste processo quando comparado com os já existentes, é o fato de que o glicerol não é a matéria-prima para a produção de biodiesel, e sim um subproduto de sua produção. Deste modo, esta fonte de carbono não compete com a demanda pelos biocombustíveis e ainda agrega valor à sua cadeia produtiva.

O processo proposto produz 74,5 toneladas de PHB por ano, com uma pureza de 98,9 % p/p. Esta produtividade foi alcançada utilizando apenas um biorreator, podendo aumentá-la empregando outros biorreatores operando em paralelo. A pureza do produto é semelhante à obtida pelo processo utilizado na BioCycle, a maior produtora mundial de PHB, cujo produto final apresenta um teor de 99,3 % p/p do biopolímero.

Um aumento previsto na produção nacional de biodiesel, devido às políticas nacionais de energia e de redução dos impactos ambientais dos combustíveis automotivos, fará com que a oferta de glicerol no Brasil cresça substancialmente. Isso é uma variável de grande relevância, pois o aumento da oferta fará com que o preço do glicerol tenda a cair, diminuindo ainda mais o custo de operação da planta de produção de PHB proposta.

A diminuição do custo operacional da planta também pode ser alcançada utilizando o glicerol cru, ou seja, o glicerol sem nenhum tratamento prévio de purificação, como substrato da fermentação. Atualmente são realizados um grande número de estudos que investigam essa possibilidade, muitos dos quais propõem apenas uma etapa de extração do sódio presente no glicerol, de modo a não inibir a atividade biológica. Outra linha de pesquisa é o desenvolvimento de linhagens de microorganismos geneticamente modificados que toleram a presença do sódio no meio.

Com todos esses fatores, a proposta de uma planta de PHB a partir do glicerol é algo factível e com um grande potencial de aplicação. Um indício desse fato é a grande quantidade de artigos científicos que buscam otimizar as

condições da fermentação, com o objetivo de promover um aumento no percentual de acúmulo de PHB no interior das células.

Como sugestão, incentiva-se promover uma integração energética da planta, de forma a evitar perdas de energia. E ainda, elaborar um estudo de viabilidade econômica deste processo, para que se possa comparar quantitativamente as perdas e ganhos das variações nos processos decorrentes da utilização das diferentes fontes de carbono. Pode-se associar à planta proposta, uma unidade de remoção de sódio visando possibilitar a integração total dos processos de produção de biodiesel e de PHB, alocando-os em um só complexo e consolidando o conceito de biorrefinaria a partir de óleos vegetais, como o que já acontece com os carboidratos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ANDERSON, A. J., DAWES, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, v. 54, p. 450-472.
- APME (2003). *Plastics: An analysis of plastics consumption and recovery in Europe*. Association of Plastic Manufactures of Europe (<http://www.apme.org>).
- ARDENGHY, R. F. (2006). *Abastecimento e Distribuição do Biodiesel: a realidade brasileira e o desafio regulatório. Apresentação do superintendente de abastecimento da Agência Nacional de Petróleo. Seminário: Comercialização e Distribuição de Biodiesel no Brasil. Fecomércio – Rio de Janeiro – RJ – Brasil.*
- ASHBY, R. D., SOLAIMAN, D. K. Y., FOGLIA, T. A. (2005). Synthesis of short-/medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) blends by mixed culture fermentation of glycerol. *Biomacromolecules*.
- ASHBY, R. D., SOLAIMAN, D. K. Y., STRAHAN, G. D. (2011). Efficient Utilization of Crude Glycerol as Fermentation Substrate in the Synthesis of Poly(3-hydroxybutyrate) Biopolymers. *Journal Am. Oil Chem. Soc.*
- ASRAR, J., HILL, J. C. (2002). Biosynthetic processes for linear polymers. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 83, p. 457-483.
- BRANDL, H., GROSS, R. A., LENZ, R. W., *et al.* (1990). "Plastics from bacteria and for bacteria: poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters", *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, v. 41, p. 77-93.
- BRAUNEGG, G., LEFEBVRE, G., GENSER, K. F. (1998), Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*, v. 65, p. 127-161.
- BYROM, D. (1987). Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *TIBTECH*, v.5, p.246-250.
- BYROM, D. (1992). Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and poly- $\beta$ -hydroxyvalerate copolymers. *Microbiol Rev.*, v. 103, p. 937-942.
- CAVALHEIRO, J. M. B. T., DE ALMEIDA, M. C. M. D., GRANDFILIS, C., DA FONSECA, M. M. R. (2009). Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochem*, v. 44(5), p. 509-15.

CHEN, Y., CHEN, J., YU, C., DU, G., LUN, S. (1999). Recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Alcaligenes eutrophus* by surfactant-chelate aqueous system. *Process Biochemistry*, v.34, p.153-157.

CHOI, J., LEE, S. Y. (1997). Process analysis and economic evaluation for poly (3-hydroxybutyrate) production by Fermentation. *Bioprocess Engineering*, v.17, p.13-21.

CHOI, J., LEE, S. Y., (1999). Efficient and economical recovery of poly (3-hydroxybutyrate) from recombinant *E. coli* by simple digestion with chemicals. *Biotechnol Bioengineering*, v.62. p.546-553.

DELGADO, C. C. R., PRADELLA, J. G. C. (2005). Seleção de linhagens para produção de polihidroxialcanoatos a partir de triglicerídeos. *Anais do XV Simpósio Nacional de Fermentações*, Recife, PE.

EPA (2003). *Municipal Solid Waste in The United States: 2001 Facts and Figures*. Environmental Protection Agency - Office of Solid Waste and Emergency Response (<http://www.epa.org>).

FAVA, A. L. B. (1997). Clonagem e expressão do regulon-screm *Alcaligenes eutrophus* visando a produção de poli-hidroxibutirato a partir de sacarose. Dissertação (Mestrado em Microbiologia)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

FINKLER, L. (2006). Produção de polihidroxialcanoatos por *Cupriavidus necator* usando ácido acrílico como fonte de carbono. Tese de doutorado, Programa de Engenharia Química, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ – Brasil.

HA, C., CHO, W. (2002). Miscibility, properties, and biodegradability of microbial polyester containing blends. *Progress in Polymer Science*, v. 27, n. 4, p. 759-809.

HAHN, S. K., CHANG, Y. K., KIM, B. S., CHANG, H. N. (1994). Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, p. 256-261.

HOLMES, P. A., LIM, G. B. (1990). Separation process. U. S. Patent, nº 4.910.145.

JACQUEL, N., LO, C. W., WEI, Y. H., WU, H. S., WANG, S. S. (2005). Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochem Eng J*, v. 39, p. 15-27.

KAPRITCHKOFF, F. M., VIOTTI, A. P., ALLI, R. C. P., ZUCCOLO, M., PRADELLA, J. G. C., MAIORANO, A. E., MIRANDA, E. A., BONOMI, A. (2005).

Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. Journal of Biotechnology, article in press.

KESSLER, B., WEUSTHUIS, R., WITHOLT, B., EGGINK, G. (2001). Production of microbial polyesters: Fermentation and Downstream Process. Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology, v.71, p.159-182.

KHANNA, S., SRIVASTAVA, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. Process Biochemistry, v. 40, p. 607-619.

KIM, M., CHO, K., RYU, H. W., LEE, E., CHANG, I. K. (2003). Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition of sodium dodecyl sulfate. Biotechnology Letters, v. 25, p.55-59.

KNOTHE, G., GERPEN, J. V., E KRAHL, J. (2005). The Biodiesel Handbook. AOCS Press, Champaign, Illinois.

KOLLER, M., BONA, R., BRAUNEGG, G., HERMANN, C., HORVAT, P., KROUTIL, M., et al. (2005). Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. Biomacromolecules, v. 6, p. 561-565.

LEE, S. Y. (1996). Plastic bacteria? Progress and prospects for PHA production in bacteria. Tibtech, v. 14, p. 431-438.

LEMOIGNE, M. (1926). "Produits de deshydratation et de polymerisation de l'acide  $\beta$ -oxybutyric", Bull. Soc. Chem. Biol., v. 8, p. 770-782.

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

MASCARENHAS, R. (2005). A Petrobras e o Biodiesel. Gerencia de energia Renovável. Diretoria de Gás & Energia. Apresentação realizada no dia 6 de maio em Canoas.

MATIAS, F., PADILLA, G., RODRIGUES, M. F. A. (2005). Utilização de fontes de carbono de baixo custo para a produção de biopolímeros de cadeia curta e média em linhagens de actinomicetos. Anais do XV Simpósio Nacional de Fermentações, Recife, PE.

NODA, I., SATKOWSKI, M. M., DOWREY, A. E., MARCOTT, C. (2004). Polymer alloys of Nodax copolymers and poly(lactic acid). Macromol Biosci, v. 4(3), p. 269-75.

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

- PARK, S. J., CHOI, J., LEE, S.Y. (2005). Engineering of *Escherichia coli* fatty acid metabolism for the production of polyhydroxyalkanoates. *Enzyme Microbiol. Technol.*, v. 36, p. 579-588.
- POSADA, J. A., NARANJO, J. M., LOPEZ, J. A., HIGUITA, J. C., CARDONA, C. A. (2010). Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 310-317.
- RAMSAY, B.A. (1994). Physiological factor affecting PHA production. *Physiology, kinetics, production and use of biopolymers (Proceedings)*. p.9-17.
- REDDY, C. S. K., GHAI, R., RASHMI, KALIA, V. C. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, v. 87, p. 137-146.
- SILVA, L. F., TACIRO, M. K., PRADELLA, J. G. C., et al. (2001). Fábrica viva de plástico biodegradável. *Ciência Hoje*, v. 29(174), p. 69-71.
- SHEN, L., HAUFE, J., PATEL, M. K. (2009). Product overview and market projection of emerging biobased plastics PRO-BIP 2009: Final report. Utrecht University. Commissioned by European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE) and European Bioplastics, p. 243.
- SOLAIMAN, D. K. Y., ASHBY, R. D., FOGLIA, T. A., MARMER, W. N. (2006). Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). *Appl Microbiol Biotechnol*, v.71, p. 783-789.
- STEINBÜCHEL, A., VALENTIN, H. (1995). Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters*, v. 128, p. 219-228.
- STEINBÜCHEL, A. (1996). PHB and other Polyhydroxyalkanoic acids. In: REHM, H. J., REED, G., ROEHR, M., editors. *Products of primary metabolism*. 2 ed. Nova York, Willey, John e Sons, p. 405-464.
- SUDESH, K., ABE, H., DOI, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.*, v. 25, p. 1503-1555.
- TAIDI, B., MANSFIELD, D. A., ANDERSON, A. J. (1995). Turnover of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) and its influence on the molecular mass of polymer accumulated by *Alcaligenes eutrophus* during batch culture. *FEMS Microbiology Letters*, v. 129, p. 201-206.
- TANAKA, K., ISHIZAKI, A., KANAMARU, T., KAWANO, T. (1994). Production of Poly-(D-3 hydroxybutyrate) from CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, and O<sub>2</sub> by high cell density autotrophic cultivation of *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 45, p. 268-275.

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

TSUGE, T. (2002). Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. *J Biosci Bioeng*, v. 94, p. 579-584.

VANZIN, C., GOMEZ, J. G. C., PRADELLA, J. G. C. (2006). Biosíntese do copolímero poli-3-hidroxi-butirato e poli-3-hidroxi-alcenoatos de cadeia média (P<sub>3</sub>HB/3HAMcl) a partir de óleo de soja. In: X Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental. Goiânia. Anais do Congresso.

WONG, H. H., VAN WEGEN, R. J., CHOI, J., LEE, S. Y., MIDDELBERG, A. P. J. (1999). Metabolic analysis of poly(3-hydroxybutyrate) production by recombinant *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol*, v. 9, p.593-603.

YAMANE, T., FUKUNAGA, M., LEE, Y.W. (1996); *Biotechnol Bioeng*, v. 50, p. 197.

YAZDANI, S. S., GONZALEZ, R. (2007). Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr Opin Biotechnol* , v. 18(3), p. 213-9.

YU, J. (2001). Production of PHA from starchy water via organic acids. *Journal of Biotechnology*, v. 86, p. 105-112.

ZINN, M., HANY, R. (2005). Tailored material properties of polyhydroxy-alkanoates through biosynthesis and chemical modification. *Advanced Engineering Materials*, v. 7, n. 5, p. 408-411.

ZINN, M., WITHOLT, B., EGLI, T. (2001). Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 53, p. 5-21.

SITES ACESSADOS EM MAIO DE 2011:

- <http://www.inp.org.br/pt/>
- <http://www.plasticseurope.org/>
- <http://www.biocycle.com.br/>