

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química**

P

P

E

Q



**TESE DE DOUTORADO**

**BIOCONVERSÃO DO GLICEROL A 1,3-  
PROPANODIOL PARA APLICAÇÃO NA  
OBTENÇÃO DO POLI(TEREFITALATO  
DE TRIMETILENO)**

*Flávia Gonçalves Domingues Ferreira*

*Yêda Medeiros Bastos de Almeida*

*Glória Maria Vinhas*

*Maria Alice Gomes de Andrade Lima*

PPEQ - Programa de Pós-Graduação  
em Engenharia Química  
Cidade Universitária- Recife – PE  
CEP. 50640-901  
Telefax: 0-xx-81- 21267289

**Recife/PE**

**Junho/2013**

# **FLÁVIA GONÇALVES DOMINGUES FERREIRA**

**BIOCONVERSÃO DO GLICEROL A 1,3-PROPANODIOL PARA APLICAÇÃO NA  
OBTENÇÃO DO POLI(TEREFTALATO DE TRIMETILENO)**

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

Linha de Pesquisa: Processo Químicos  
Industriais

Orientadores: Profa. Dra. Yêda Medeiros  
Bastos de Almeida  
Profa. Dra. Glória Maria Vinhas  
Profa. Dra. Maria Alice Gomes de  
Andrade Lima

Recife  
2013

Catalogação na fonte  
Bibliotecário Marcos Aurélio Soares da Silva, CRB-4 / 1175

F383b	<p>Ferreira, Flávia Gonçalves Domingues. Bioconversão do glicerol A 1,3- propanodiol para aplicação na obtenção do Poli (Tereftalato de Trimetileno) / Flávia Gonçalves Domingues Ferreira. - Recife: O Autor, 2013. 137 folhas, il., gráfs., tabs.</p> <p>Orientadora: Profª Drª. Yêda Medeiros Bastos de Almeida. Coorientadora: Prof.ª Dr.ª Glória Maria Vinhas. Coorientadora: Profª Drª Maria Alice Gomes de Andrade Lima Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2013. Inclui Referências, Apêndice e Anexos.</p> <p>1. Engenharia Química. 2.Glicerol. 3.Proniodiol Poli. 4.Processos Bioquímicos. I. Almeida, Yêda Medeiros Bastos (Orientadora). II. Título.</p>
	UFPE 660.2 CDD (22. ed.)      BCTG/2013-210

**Flávia Gonçalves Domingues Ferreira**

**BIOCONVERSÃO DO GLICEROL A 1,3-PROPANODIOL PARA APLICAÇÃO NA OBTENÇÃO DO POLI(TEREFTALATO DE TRIMETILENO).**

**Linha de Pesquisa: Processos Químicos Industriais**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, defendida e aprovada em 03 de junho de 2013 pela banca examinadora constituída pelos seguintes membros:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Yêda Medeiros Bastos de Almeida - DEQ/UFPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Glória Maria Vinhas - DEQ/UFPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Alice Gomes de Andrade Lima - DEQ/UFPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrelina Maria Pinheiro Santos - DEQ/UFPE

---

Prof. Dr. Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha - DEQ/UFPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janete Magali de Araújo - CCB/UFPE

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Kleber Gonçalves Bezerra Alves- Engenharia Mecânica/UFPE

## AGRADECIMENTOS

- Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.
- Agradeço aos meus pais Joélcio e Diva, pela vida em primeiro lugar. Pela dedicação aos filhos, a educação, os ensinamentos e o incentivo que me deram durante toda a vida.
- Agradeço ao meu marido George pelo amor e compreensão nos momentos de "crise". E por acreditar em mim sempre! Ao meu filho João Otávio pelo simples fato de existir em minha vida e me proporcionar um amor incondicional e ser o motivo de constante alegria em minha vida.
- Agradeço a minha querida amiga Professora Yêda Medeiros Bastos de Almeida, por ter aberto as "portas" de seu Laboratório e por acreditar em mim, investindo assim sua confiança; por sua contribuição em minha formação e pela oportunidade de "crescimento". Pela paciência, apoio, carinho e atenção; pelas valiosas sugestões; por estar sempre disponível mesmo tão ocupada.
- Agradeço a grande amiga Professora Glória Maria Vinhas pelo incentivo; por ter me ensinado tanto com seu exemplo de vida e dedicação ao trabalho; pelas valiosas sugestões durante todo o trabalho; pela atenção e dedicação. Obrigada por me encorajar sempre!
- À Professora María Alice Gomes de Andrade Lima pela amizade, seus ensinamentos e por sempre acreditar em meu potencial. Muito obrigada.
- À Professora Andrelina Pinheiro pela valiosa contribuição, apoio, sabedoria e amizade, mesmo não fazendo parte diretamente do trabalho. Obrigada pela atenção a mim dispensada sempre que solicitada.
- A Professora Rosa Maria Souto Maior pela disponibilização do Laboratório de Polímeros (DQF) para a execução das atividades experimentais na etapa de polimerização do PTT.
- A Fundação de Amparo à Pesquisa de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de doutorado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB) pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento deste trabalho.
- Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da UFPE.
- Aos colegas do Laboratório de Materiais Poliméricos e Caracterização e do Laboratório de Microbiologia Industrial, professores, graduandos, pós-graduandos, técnicos, pela convivência, pela amizade e harmonia do laboratório. As amigas Roseana, Cristiane e Virgínia pela valiosa contribuição nos ensaios de fermentação. Ao colega Paulo pela grande ajuda nas reações de polimerização.
- Aos amigos da turma de doutorado de 2008 principalmente a amiga Solange pelo companheirismo e apoio em todos os momentos, e por toda a ajuda fundamental dada por ela.
- Agradeço, por fim, a Deus, que concedeu o dom da vida e por sempre ter colocado anjos no meu caminho.

## RESUMO

A indústria biotecnológica futura deverá ser responsável pela produção de muitos dos bens de consumo que hoje são derivados do petróleo, como plásticos e combustíveis. Atualmente, obtido por síntese química a partir de derivados do petróleo, o 1,3-propanodiol (1,3-PDO) é uma substância que tem despertado crescente interesse das indústrias químicas. Devido às suas inerentes propriedades, pode ser utilizado como monômero para o desenvolvimento de novos polímeros, como o poli(tereftalato de trimetileno) - PTT. Este é um termoplástico com propriedades físico-químicas semelhantes ao poli(etileno tereftalato) (PET) sendo este o fator que mais tem contribuído para o interesse da indústria na obtenção do 1,3-PDO de forma abundante, mais econômica e sustentável. Embora o 1,3-PDO já seja produzido industrialmente por um processo fermentativo, a partir da glicose, a matéria-prima utilizada neste trabalho é diferente e inovadora, o glicerol, que se tem disponível em grande quantidade e baixo custo no país, o que modifica todo entendimento das vias metabólicas, assim como, dos parâmetros envolvidos no processo. Este é gerado em grande quantidade durante a produção de biodiesel e tem se tornado um substrato potencialmente atrativo para a produção bacteriana de produtos de valor agregado, como o 1,3-PDO. Além disso, o micro-organismo a ser utilizado também é importante, pois direcionará os controles mais fundamentais do processo e os subprodutos que são formados. O presente trabalho teve como objetivo a produção de 1,3-propanodiol por via biotecnológica a partir da fermentação do glicerol e a síntese do PTT. A primeira parte do trabalho visou avaliar a produção do 1,3-PDO por quatro cepas: *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259, *Clostridium butyricum* DSMZ 10702. Três linhagens mostraram-se capazes de produzir 1,3-PDO. O *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 apresentou maior rendimento no produto de interesse. Para otimização das condições de cultivo, utilizou-se a seleção de variáveis através do delineamento experimental Plackett-Burman (PB) avaliando a produção de 1,3-PDO. As melhores condições de fermentação foram pH (6,5-7,0), temperatura ( $35,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) e concentração de glicerol ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ ). A partir da definição das melhores condições de cultivo, os ensaios foram repetidos utilizando glicerol residual. Foi avaliada a cinética de crescimento do *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 por ser o micro-organismo que apresentou bons resultados quanto ao aumento de biomassa e produção do 1,3-PDO durante a fermentação. Em outra etapa foi realizada a polimerização do PTT em regime de batelada utilizando-se o 1,3-propanodiol comercial e caracterizado por FTIR e DSC. Na análise de FTIR os comprimentos de onda dos grupos funcionais característicos do poliéster foram identificados, como carbonila, aromático e éster. Já com a análise de DSC o comportamento térmico do PTT foi caracterizado, apresentando temperatura de fusão de  $195,25 \pm 9,92^\circ\text{C}$  e a partir desse resultado determinou-se sua cristalinidade, em torno de 60%.

**Palavras chave:** Glicerol. *Clostridium*. 1,3-propanodiol. Poli(tereftalato de trimetileno). Planejamento Plackett-Burman.

## ABSTRACT

The biotechnology industry future should be responsible for the production of many consumer goods that today are derived from petroleum, such as plastics and fuels. Currently, chemically synthesized from petroleum derivatives, 1,3-propanediol (1,3-PDO) is a substance that has attracted increasing interest of the chemical. Because of its inherent properties can be used as monomer for the development of new polymers such as poly (trimethylene terephthalate) (PTT). This is a thermoplastic with physicochemical properties similar to poly (ethylene terephthalate) (PET) which is the most important factor that has contributed to the industry's interest in obtaining the 1,3-PDO so abundant, most economical and sustainable. Although the 1,3-PDO is already produced industrially by fermentation from glucose, the raw material used in this study is different and innovative as glycerol, which is available in large quantities and low cost in our country, modifying all the understanding of metabolic pathways, as well as the parameters involved in the process. Glycerol is generated in large quantities during the production of biodiesel and has become a potentially attractive substrate for bacterial production of value-added products, such as 1,3-PDO. In addition, the microorganism to be used is also of extreme importance since direct the most important controls the process and the products which are formed. The present study aimed to the production of 1,3-propanediol by biotechnological from the fermentation of glycerol and synthesis of PTT. The first part of the study aimed to evaluate the production of 1,3-PDO by four strains: *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259, *Clostridium butyricum* DSMZ 10702. Three micro-organisms were capable of producing 1,3-PDO. *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 had the highest yield in the product of interest. Optimization of culture conditions, we used the variable selection through experimental Plackett-Burman (PB) evaluating the production of 1,3-PDO. The best fermentation conditions were pH (6.5 to 7.0), temperature (35 to 35.5 °C) and glycerol concentration (10 g.L<sup>-1</sup>). From the definition of the best growing conditions the tests were repeated using residual glycerol. We evaluated the growth kinetics of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 to be the micro-organism that showed good results in increased biomass and yield of 1,3-PDO during fermentation. In another step of the polymerization was performed under fed-batch PTT using 1,3-propanediol and commercial characterized by FTIR and DSC. At the FTIR analysis the wavelengths characteristic of the functional groups of the polyester were identified as carbonyl and aromatic ester. Already with the analysis of the DSC thermal behavior of PTT has been characterized, showing the melting temperature of 195.25 ± 9.92°C and calve this result was determined crystallinity, around 60%

**Keyword:** Glycerol. *Clostridium*. 1,3-propanediol. Poly(trimethylene terephthalate). Plackett-Burman Design.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Fórmula estrutural do glicerol.	17
<b>Figura 2</b>	Fórmula estrutural do 1,3-propanodiol.	19
<b>Figura 3</b>	Mecanismo para produção de 1,3-PDO a partir de acroleína.	23
<b>Figura 4</b>	Mecanismo para produção de 1,3-PDO a partir do óxido de etileno.	24
<b>Figura 5</b>	Esquema do metabolismo do glicerol pelas vias oxidativa e redutiva de alguns micro-organismos.	26
<b>Figura 6</b>	Via metabólica da fermentação do glicerol.	28
<b>Figura 7</b>	Rota enzimática de produção de 1,3-PDO a partir da glicose.	31
<b>Figura 8</b>	Células de <i>Clostridium acetobutylicum</i> observadas por microscopia eletrônica de varredura.	33
<b>Figura 9</b>	Células de <i>Clostridium butyricum</i> observadas por microscopia eletrônica de varredura.	34
<b>Figura 10</b>	Esquema da produção de hidrogênio pelo <i>Clostridium butyricum</i> .	35
<b>Figura 11</b>	Esquema geral de um processo fermentativo.	38
<b>Figura 12</b>	Definição dos fatores envolvidos.	42
<b>Figura 13</b>	Representação da velocidade específica em função da concentração do substrato.	47
<b>Figura 14</b>	Produção do poli(tereftalato de trimetileno) - PTT a partir da reação entre o ácido tereftálico (AT) e 1,3-propanodiol (1,3-PDO).	49
<b>Figura 15</b>	Preparação dos meios de crescimento e cultivo.	55
<b>Figura 16</b>	Unidade experimental utilizada na síntese do Politemeftalato de trimetileno – PTT.	62
<b>Figura 17</b>	Crescimento das linhagens de <i>Clostridium</i> (A) em meio tioglicolato de sódio e (B) em RCM.	64
<b>Figura 18</b>	Curvas de calibração dos (A) <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 4259, (B) <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824, (C) <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 10132 e (D) <i>Clostridium butyricum</i> DSMZ 10702.	66
<b>Figura 19</b>	Crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO para <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 4259 no (A) Meio 1, (B) Meio 2 e (C) Meio 3.	68
<b>Figura 20</b>	Comparação entre os valores de biomassa e glicerol calculados pelo modelo de Monod (linhas sólidas) e dados experimentais (símbolos) para a fermentação do glicerol pelo <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 4259.	73
<b>Figura 21</b>	Crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO para <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 no (A) Meio 1, (B) Meio 2 e (C) Meio 3.	74
<b>Figura 22</b>	Crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO para <i>Clostridium butyricum</i> DSMZ 10702 no (A) Meio 1, (B) Meio 2 e (C) Meio 3.	77

<b>Figura 23</b>	Produção de 1,3-PDO e crescimento biomassa das linhagens de <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 e ATCC 4259 e <i>Clostridium butyricum</i> DSMZ 10702 em 72 horas de fermentação com 10 g.L <sup>-1</sup> de glicerol P.A.	82
<b>Figura 24</b>	Rendimentos das linhagens de <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 e ATCC 4259 e <i>Clostridium butyricum</i> DSMZ 10702 em 72 horas de fermentação com 10 g.L <sup>-1</sup> de glicerol P.A.	83
<b>Figura 25</b>	Perfis cinéticos da fermentação do glicerol pelo <i>Clostridium butyricum</i> DSMZ 10702 dos ensaios do planejamento experimental Plackett-Burman.	85
<b>Figura 26</b>	Crescimento celular, consumo de glicerol cru e produção de 1,3-PDO para <i>Clostridium butyricum</i> DSMZ 10702 no (A) ensaio 1 e (B) ensaio 2.	95
<b>Figura 27</b>	Crescimento celular, consumo de glicerol cru e produção de 1,3-PDO para <i>Clostridium butyricum</i> DSMZ 10702 no (A) ensaio 3 e (B) ensaio 4.	96
<b>Figura 28</b>	Polí(tereftalato de trimetileno) obtido pela reação de policondensação, (A) batelada 1 e (B) batelada 2.	99
<b>Figura 29</b>	Cromatograma da amostra de condensado coletada ao fim da reação de policondensação do PTT (batelada 1).	100
<b>Figura 30</b>	Cromatograma da amostra de condensado coletada ao fim da reação de policondensação do PTT (batelada 2).	100
<b>Figura 31</b>	Especro no infravermelho do PTT sintetizado, (A) batelada 1 e (B) batelada 2.	102
<b>Figura 32</b>	Curva DSC das amostras de PTT sintetizados, (A) batelada 1 e (B) batelada 2 (sem nenhum tratamento térmico).	103
<b>Figura 33</b>	Curva DSC das amostras de PTT (taxa de aquecimento, 10°C/min).	104
<b>Figura 34</b>	Curvas de calibração dos micro-organismos (A) <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 4259, (B) <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824, (C) <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 10132 e (D) <i>Clostridium butyricum</i> DSMZ 10702.	131

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Propriedades físico-químicas do glicerol.	18
<b>Tabela 2</b>	Propriedades físico-químicas do 1,3-propanodiol.	20
<b>Tabela 3</b>	Planejamento Plackett-Burman.	43
<b>Tabela 4</b>	Características das resinas poli(tereftalato de etileno), nylon e poli(tereftalato de trimetileno).	50
<b>Tabela 5</b>	Meios de cultivo utilizados nos experimentos.	56
<b>Tabela 6</b>	Níveis das variáveis utilizadas no Planejamento Plackett-Burman para avaliação dos nutrientes e condições de cultivo na produção de 1,3-propanodiol, glicerol remanescente e biomassa realizada na fermentação em batelada.	58
<b>Tabela 7</b>	Planejamento experimental delineamento Plackett- Burman.	58
<b>Tabela 8</b>	Condições operacionais aplicadas nas reações de polimerização do PTT.	63
<b>Tabela 9</b>	Rendimentos da fermentação do glicerol P.A. pelo <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 4259 nos meios de cultivo 1, 2 e 3.	70
<b>Tabela 10</b>	Parâmetros cinéticos da fermentação em batelada do glicerol pelo <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 4259.	72
<b>Tabela 11</b>	Rendimentos da fermentação do glicerol P.A. pelo <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 nos meios de cultivo 1, 2 e 3.	75
<b>Tabela 12</b>	Rendimentos da fermentação do glicerol P.A. pelo <i>Clostridium butyricum</i> DSMZ 10702 nos meios de cultivo 1, 2 e 3.	78
<b>Tabela 13</b>	Parâmetros da fermentação do glicerol por linhagens de <i>Clostridium</i> .	80
<b>Tabela 14</b>	Ensaio do Planejamento Plackett-Burman tendo como resposta o consumo de glicerol ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), produção de 1,3-propanodiol ( $\text{g/L}$ ) e crescimento de biomassa ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) em 72 horas de fermentação.	88
<b>Tabela 15</b>	Efeito individual das 8 variáveis analisadas na produção do 1,3-PDO em 72 horas de fermentação.	89
<b>Tabela 16</b>	Efeito individual das 8 variáveis analisadas para a produção de biomassa em 72 horas de fermentação.	90
<b>Tabela 17</b>	Efeito individual das 8 variáveis analisadas no consumo de glicerol em 24 horas de fermentação.	90
<b>Tabela 18</b>	Meios de cultivo utilizados na fermentação do glicerol bruto pelo <i>Clostridium butyricum</i> DSMZ 10702.	94
<b>Tabela 19</b>	Rendimentos das culturas em batelada do <i>Clostridium butyricum</i> DSMZ 10702 em glicerol P.A. e glicerol bruto nas mesmas condições em 72 horas de fermentação.	97
<b>Tabela 20</b>	Propriedades térmicas e grau de cristalinidade para o PTT sintetizado.	105

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

AT	Ácido tereftálico
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
CLAE	Cromatografia líquida de alta performance
DhaD	Glicerol desidrogenase
Dha	Dihidroxiacetona
DhaK	Dihidroxiacetona quinase
DhaP	Difidrixiacetona fosfato
DhaT	1,3-propanodiol oxiredutase
DSC	Calorimetria diferencial exploratória
DSM	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures
DSMZ	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures
GDHt	Glicerol desidratase
IV	Infravermelho
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo estado oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo estado reduzido
NADH <sub>2</sub>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
OE	Óxido etileno
PABA	Ácido para aminobenzóico
PB	Planejamento Plackett-Burman
PBT	Poli(butileno tereftalato)
PET	Poli(tereftalato de etileno)
PHA	polihidroxialcanoato
PTT	Poli(tereftalato de trimetileno)
1,3-PDO	1,3-propanodiol
3-HPA	3-hidroxipropionaldeído

## LISTA DE NOMENCLATURA

$K_S$	Constante de saturação de Monod (g.L <sup>-1</sup> )
$P_0$	Concentração inicial do 1,3-propanodiol (g.L <sup>-1</sup> )
$P$	Concentração final do 1,3-propanodiol (g.L <sup>-1</sup> )
$r^2$	Coeficiente de correlação
$S_0$	Concentração inicial de glicerol (g.L <sup>-1</sup> )
$S$	Concentração final de glicerol (g.L <sup>-1</sup> )
$T_c$	Temperatura de cristalização (°C)
$T_g$	Temperatura de transição vítreia (°C)
$T_m$	Temperatura de fusão cristalina (°C)
$X_0$	Concentração inicial de biomassa (g.L <sup>-1</sup> )
$X$	Concentração final de biomassa (g.L <sup>-1</sup> )
$Y_{X/S}$	Conversão de glicerol em biomassa (mol.mol <sup>-1</sup> )
$Y_{P/S}$	Conversão de glicerol em 1,3-propanodiol (mol.mol <sup>-1</sup> )

### ***Letras gregas***

$\mu$	Velocidade de crescimento celular (h <sup>-1</sup> )
$\mu_{\max}$	Velocidade máxima do crescimento celular (h <sup>-1</sup> )
$\Delta H_m$	Entalpia de fusão da amostra (J.g <sup>-1</sup> );
$\Delta H_m^0$	Entalpia de fusão do polímero 100% cristalino (J.g <sup>-1</sup> )

# SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE NOMENCLATURA

## CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS	16

## CAPÍTULO 2

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Glicerol	17
2.2 1,3-propanodiol	19
2.3 Produção de 1,3-propanodiol	21
2.3.1 Produção por via química	22
2.3.1.1 Hidratação de acroleína seguido por hidrogenação	22
2.3.1.2 Hidroformilação e hidrogenação de óxido de etileno	23
2.3.2 Produção por via biotecnológica	24
2.3.2.1 Processo fermentativo a partir do glicerol	24
2.3.2.2 Processo fermentativo a partir da glicose	30
2.4 Bactérias do gênero <i>Clostridium</i>	31
2.5 Meio de cultivo	37
2.6 Planejamento experimental	40
2.6.1 Método de Plackett-Burman (PB)	42
2.7 Estudo cinético	44
2.8 Poli(tereftalato de trimetileno) – PTT	49
2.8.1 Produção comercial de PTT	50

## CAPÍTULO 3

3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	53
3.1 Produção do 1,3-propanodiol	53
3.1.1 Reagentes	53
3.1.2 Equipamentos	54
3.1.3 Micro-organismos	54
3.1.3.1 Conservação	55
3.1.4 Meios de cultura	55
3.1.4.1 Manutenção e crescimento	55
3.1.4.2 Inóculo	56
3.1.4.3 Meio de cultivo	56
3.1.5 Fermentação do glicerol	56
3.1.6 Cinética de crescimento microbiano	57

3.1.7 Aplicação do planejamento experimental Plackett-Burman (PB) para a produção de 1,3-propanodiol por <i>Clostridium butyricum</i> DSMZ 10702	57
3.1.8 Tratamento dos dados experimentais	58
3.1.8.1 Fatores de conversão	58
3.1.9 Métodos analíticos	59
3.1.9.1 Análise do glicerol bruto	59
3.1.9.2 Curva de calibração de biomassa	60
3.1.9.3 Determinação de biomassa	60
3.1.9.4 Identificação e quantificação do 1,3-PDO e glicerol por CLAE	60
3.2 Produção do poli(tereftalato de trimetileno) – PTT	61
3.2.1 Reagentes	61
3.2.2 Reator de polimerização	61
3.2.3 Policondensação do poli(tereftalato de trimetileno) – PTT	63
3.2.4 Técnicas de Caracterização do PTT	64
3.2.4.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	64
3.2.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	65
<b>CAPÍTULO 4</b>	
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1 Seleção das linhagens de <i>Clostridium</i>	66
4.2 Curva de calibração para avaliar o crescimento celular dos micro-organismos	67
4.3 Fermentação do glicerol P.A.	67
4.3.1 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 4259	67
4.3.1.1 Cinética de crescimento do <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 4259	71
4.3.2 <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	73
4.3.3 <i>Clostridium butyricum</i> DSMZ 10702	76
4.4 Planejamento experimental Plackett-Burman	83
4.5 Fermentação do glicerol bruto	93
4.6 Poli(tereftalato de trimetileno) – PTT	99
4.6.1 Obtenção do poli(tereftalato de trimetileno)	99
4.6.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	101
4.6.3 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)	103
<b>CAPÍTULO 5</b>	
5. CONCLUSÕES	107
<b>CAPÍTULO 6</b>	
6. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	109
<b>CAPÍTULO 7</b>	
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
<b>APÊNDICE</b>	
APÊNDICE A	133
<b>ANEXO</b>	
1 Produção científica	135
1.1 Artigo publicado	135
1.2 Trabalhos publicados em Congressos Nacionais	135

## CAPÍTULO 1

### 1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia passa por contínua evolução, com a aplicação de conhecimentos e metodologias provenientes de diferentes campos: engenharia genética, biologia molecular, engenharia bioquímica, entre outros (BORZANI *et al.*, 2001).

Os processos biotecnológicos se dividem em duas categorias: reações de crescimento microbiano (reações microbiológicas), e reações catalisadas por enzimas (reações bioquímicas ou biotransformações). Esses processos são usados para a produção de uma variedade de produtos com diferentes valores comerciais. Um processo biotecnológico, de maneira geral, pode ser definido como aquele em que há a utilização de micro-organismos (leveduras, bactérias, entre outros) e/ou enzimas, podendo ter como objetivo a síntese de compostos químicos intracelulares como proteínas ou extracelulares como, antibióticos e álcool, a produção de biomassa, de alimentos (bebidas), de energia (biogás, etanol).

A indústria biotecnológica vindo sendo responsável pela produção de muitos bens de consumo que hoje são derivados do petróleo, como plásticos e combustíveis. Deste modo, os biocombustíveis surgiram como uma alternativa viável aos combustíveis fósseis, podendo ainda contribuir para minimizar os danos ao meio ambiente provocados pelo uso intensivo do petróleo. O Brasil foi o primeiro país do mundo a implantar um amplo programa de combustível alternativo, em substituição total ou parcial a gasolina, ao inserir o etanol, no ano de 1973, na matriz energética brasileira. Este biocombustível pode ser adicionado ao diesel fóssil em diferentes proporções. Do mesmo modo que no caso do etanol brasileiro, agregar valor aos subprodutos gerados pela cadeia de produção de biodiesel é essencial para que este biocombustível se torne competitivo em relação ao diesel fóssil (SILVA, 2010).

O biodiesel é produzido a partir de óleos e gorduras. Uma reação de transesterificação entre o triacilglicerol e um álcool libera os ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e o glicerol. A relação entre biodiesel e glicerol é de aproximadamente 10:1 (v/v), ou seja, para cada 100 litros de biodiesel são produzidos aproximadamente 10 litros de glicerol bruto (SILVA, 2010).

Com o aumento evidente da produção deste biocombustível no Brasil e no mundo, o glicerol vai passar a ser um subproduto excedente. Este aumento substancial de biodiesel já surtiu efeito no preço do glicerol, que caiu drasticamente nos últimos anos. Uma alternativa para a utilização deste produto é a sua conversão em bioproductos como 1,3-propanodiol (monômero básico na indústria de polímeros), PHAs (polihidroxialcanoatos), ácido cítrico, bioplástico, produção de enzimas como lipases, hidrogênio e etanol (RIVALDI *et al.*, 2007). O 1,3-propanodiol (1,3-PDO) é utilizado como um monômero para a obtenção do polímero poli(tereftalato de trimetileno) (PTT), um termoplástico com propriedades físico-químicas superiores ao poli(tereftalato de etileno) (PET).

Atualmente obtido por síntese química a partir de derivados do petróleo, o 1,3-PDO é uma substância que tem despertado crescente interesse das indústrias químicas. Devido às suas propriedades, a possibilidade de desenvolvimento de novos polímeros é o fator que mais tem contribuído para o interesse da indústria na obtenção do 1,3-PDO de forma abundante, mais econômica e sustentável.

Deste modo, a adoção do biodiesel, um combustível de base biotecnológica, pode contribuir decisivamente para o desenvolvimento de outro importante setor biotecnológico, ou seja, a produção de plásticos de fontes renováveis, assim interligando e proporcionando o desenvolvimento de áreas biotecnológicas que competem diretamente com os derivados do petróleo.

Na literatura vários trabalhos utilizam *Klebsiella* e *Citrobacter*, que são bactérias anaeróbias, como produtoras desse bioproduto (BIEBL e MARTEN, 1995; DANIEL *et al.*, 1995a,b; HUANG *et al.*, 2002; LIN e MAGASANIK, 1960; RUCH e LIN, 1975; SEIFERT *et al.*, 2001; SEYFRIED *et al.*, 1996; STREEKSTRA *et al.*, 1987). O grande incoveniente em trabalhar com essas linhagens é que são patogênicas, necessitando condições especiais de manuseio. Sendo assim, o estudo para a produção do 1,3-PDO por outros micro-organismos que sejam menos patógenos, mas que apresentem bons resultados, motivou a realização desse estudo.

O desafio posto pelo caráter intrinsecamente multidisciplinar da pesquisa neste campo foi considerado como um estímulo ao trabalho integrado entre as áreas de pesquisa em Processos Biotecnológicos e Desenvolvimento de Materiais Poliméricos. Esta tese de doutorado se insere, assim, em linhas de pesquisas articuladas entre os grupos de biotecnologia e de materiais poliméricos e caracterização do DEQ/UFPE. A primeira diz respeito a produção do 1,3-propanodiol (1,3-PDO) pela bactéria

*Clostridium* e a segunda é a síntese do poli(tereftalato de trimetileno). Nos estudos iniciais deste trabalho consistiu nas seguintes etapas: definição do meio de cultura, tempo de incubação e métodos analíticos a serem empregados (FERREIRA *et al.*, 2010a; 2010b; LACERDA *et al.*, 2012; MORAES, 2011).

O estudo da fermentação do glicerol por bactérias do gênero *Clostridium* para a produção do 1,3-propanodiol, iniciou-se pela seleção das linhagens produtoras desse bioproduto, escolha do meio de crescimento e meio de cultivo utilizado na fermentação. Com o objetivo de melhorar o rendimento da produção do 1,3-PDO foi feito um estudo com os nutrientes do meio de cultivo, utilizado na fermentação, empregando o planejamento experimental do tipo Plackett-Burman. O estudo cinético para acompanhar o crescimento celular e consumo de glicerol foi realizado utilizando o modelo de Monod. Também foi desenvolvido o reator para realizar a polimerização do poli(tereftalato de trimetileno) e a caracterização do mesmo.

Para o melhor entendimento de todo trabalho desenvolvido, a tese se encontra organizada da seguinte forma:

- **Capítulo 1** - Introdução: apresenta uma visão geral de bioprocessos e do processo de polimerização;
- **Capítulo 2** - Revisão bibliográfica: histórico e importância do 1,3-propanodiol, glicerol, meio de cultivo, produção do 1,3-propanodiol, poli(tereftalato de trimetileno);
- **Capítulo 3** - Materiais e métodos: descreve todos os materiais e equipamentos utilizados e a metodologia experimental dos ensaios para a fermentação do glicerol, e produção do poli(tereftalato de trimetileno);
- **Capítulo 4** - Resultados experimentais: apresenta e discute a seleção das linhagens de *Clostridium*, dos meios de crescimento e produção, os resultados das fermentações, o planejamento Plackett-Burman, a cinética de crescimento, a produção e caracterização do poli(tereftalato de trimetileno) produzido;
- **Capítulo 5** - Conclusões: apresenta as conclusões obtidas durante e as sugestões para trabalhos futuros;
- **Capítulo 6** - Perspectivas para trabalhos futuros;
- **Capítulo 7** - Referências bibliográficas;
- **Apêndice** - Curvas de calibração dos micro-organismos *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259, *Clostridium butyricum* DSMZ 10702;
- **Anexo** - Produção científica.

## 1.1 OBJETIVOS

### Objetivo geral

O objetivo principal desta tese consistiu em produzir o 1,3-propanodiol a partir do glicerol P.A. e glicerol bruto por via microbiana utilizando bactérias anaeróbias do gênero *Clostridium*. Também fez parte do trabalho o estudo da polimerização do poli(tereftalato de trimetileno) – PTT obtido a partir do 1,3-propanodiol.

### Objetivos específicos

Para alcançar este objetivo geral foram realizadas as seguintes etapas:

1. Selecionar as linhagens de *Clostridium* através do aumento de biomassa nos meios de crescimento;
2. Definir o meio de cultivo que será utilizado na fermentação assim como as condições do processo;
3. Realizar as fermentações com glicerol P.A. e glicerol bruto utilizando o micro-organismo *Clostridium*;
4. Avaliar a utilização do Modelo Cinético de Monod para descrever melhor o aumento de biomassa e consumo de glicerol P.A. pelo micro-organismo *Clostridium*;
5. Aplicar a técnica do planejamento experimental do tipo Plackett-Burman para selecionar os componentes do meio de cultivo que influencia no processo fermentativo;
6. Definir e montar o reator para realizar as polimerizações;
7. Sintetizar o poli(terfetalato de trimetileno) – PTT utilizando o 1,3-PDO comercial;
8. Analisar o PTT por infravermelho (FTIR) e calorimetria diferencial exploratória (DSC).

## CAPÍTULO 2

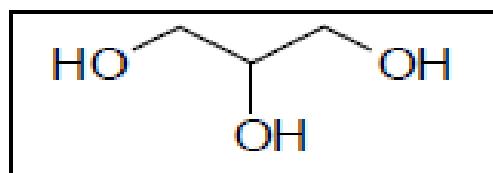
### 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1 GLICEROL

O glicerol é um produto largamente utilizado na indústria química e farmacêutica quando se encontra totalmente puro, ou seja, com pureza superior a 95%. Contudo, a demanda de glicerol no mercado brasileiro tem crescido bastante devido ao aumento da produção de biodiesel, que tem sido impulsionada por incentivos do governo. Em 2010 a produção de biodiesel foi de aproximadamente 2,4 bilhões de litros, gerando cerca de 240 milhões litros de glicerol bruto, quantidade que o mercado brasileiro não é capaz de consumir nessas condições sem um tratamento prévio. A purificação do glicerol oriundo do biodiesel torna a sua utilização inviável, pois é um processo com custo elevado. Por isso, novas aplicações para esse glicerol precisam ser desenvolvidas e/ou as vias existentes precisam ser expandidas.

Uma aplicação para este excedente de glicerol que vem ganhando destaque é sua utilização em bioprocessos, como matéria-prima para produção de alguns produtos comercialmente importantes, tais como biossurfactantes, ácidos orgânicos, álcoois (AMARAL *et al.*, 2009).

O glicerol (Figura 1), também conhecido como propano-1,2,3-triol, é um composto orgânico pertencente à função álcool.



**Figura 1** – Fórmula estrutural do glicerol.

É líquido à temperatura ambiente, higroscópico, inodoro, viscoso e de sabor adocicado. O termo glicerina refere-se ao produto na forma comercial, com pureza acima de 95%. Vários níveis e designações para denominar o glicerol estão disponíveis comercialmente, sendo o que os diferem é a porcentagem de glicerol e outras

características, tais como cor, odor e impurezas. A chamada glicerina loira é normalmente utilizada para designar a glicerina oriunda dos processos de produção do biodiesel, onde a fase glicerinosa sofreu um tratamento ácido para neutralização do catalisador e remoção de ácidos graxos eventualmente formados no processo. Em geral, esta glicerina contém cerca de 80% de glicerol, além de água, metanol e sais dissolvidos (ARRUDA *et al.*, 2007; MOTA *et al.*, 2009). A Tabela 1 apresenta as características físico-químicas do glicerol. Devido às suas características físicas e químicas, o glicerol puro apresenta diferentes aplicações na indústria de cosméticos, farmacêutica, detergentes, na fabricação de resinas e aditivos para a indústria de alimentos. Apesar do glicerol apresentar estas aplicações na forma pura, poucos estudos estão sendo direcionados para a utilização de glicerol bruto na forma direta (ARRUDA *et al.*, 2007).

**Tabela 1 – Propriedades físico-químicas do glicerol.**

Fórmula molecular	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>
Massa molar	92,09 g.mol <sup>-1</sup>
Densidade (glicerol 100%) 25°C	1,262 kg.m <sup>-3</sup>
Viscosidade 20°C	939 cps
Ponto de ebulição (101,3 kPa)	290°C
Ponto de fusão	18°C
Ponto de inflamação	177°C
Tensão superficial 20°C	63,4 mN/m
Calor específico (glicerol 99,94%) 26°C	2,435 J/g
Calor de evaporação 55°C	55°C 88,12 J/mol
Calor de dissolução	5,8 kJ/mol
Calor de formação	667,8 kJ/mol
Condutividade térmica	0,28 W/(m.K)

Fonte: ARRUDA *et al.*, 2007.

A utilização do glicerol em processos microbianos é de grande importância, visto que é um composto considerado fundamental dentro do sistema metabólico de micro-organismos, atuando como precursor de numerosos compostos e como regulador de vários mecanismos bioquímicos intracelulares (RIVALDI *et al.*, 2007). Como citado anteriormente, o principal problema para a utilização do glicerol residual em processos fermentativos é a grande quantidade de sais presentes, oriundos da produção do

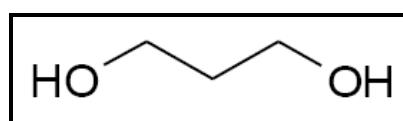
biodiesel via catálise básica, o qual pode inibir o crescimento microbiano e diminuir a formação de produtos (ITO *et al.*, 2005). Por outro lado, a suspensão de glicerol contém elementos nutricionais como fósforo, magnésio, cálcio, enxofre, nitrogênio e sódio que são passíveis de serem utilizados pelos micro-organismos para o seu crescimento durante processos fermentativos (ÇELIK *et al.*, 2008).

O glicerol é considerado uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbicas e anaeróbicas para a obtenção de energia metabólica, como regulador do potencial redox e para a reciclagem de fosfato inorgânico dentro da célula (RIVALDI *et al.*, 2007). Vários estudos foram desenvolvidos visando a utilização de glicerol como fonte de carbono por micro-organismos, especialmente por bactérias. Muitos deles apontam principalmente mecanismos de assimilação de glicerol por estes micro-organismos para a produção de compostos intermediários de polímeros, resinas e aditivos para combustíveis (CHENG *et al.*, 2007; ITO *et al.*, 2005; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002).

## 2.2 1,3-PROPANODIOL

O 1,3-propanodiol (1,3-PDO) é um dos primeiros produtos conhecido da fermentação, pois foi descoberto em 1881 pelo químico Austríaco August Freund, em cultura mista de fermentação contendo *Clostridium pasteurianum* (SAXENA *et al.*, 2009; BIEBL *et al.*, 1999). Apesar de ter sido descoberto há várias décadas e de apresentar interessantes propriedades físico-químicas para aplicações industriais, a impossibilidade de sua obtenção de forma abundante e econômica fez com que o 1,3-propanodiol apresentasse aplicação limitada durante muitos anos (DECKWER, 1995).

O 1,3-PDO também conhecido como trimetilenoglicol ou 1,3-di-hidroxipropano, é um diol contendo três átomos de carbono e duas hidroxilos em sua estrutura como mostra a Figura 2.



**Figura 2** – Fórmula estrutural do 1,3-propanodiol.

Em condições normais de temperatura e pressão, o 1,3-propanodiol é um líquido viscoso, transparente e incolor, miscível com água e com etanol. Suas principais propriedades físico-químicas estão apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2 – Propriedades físico-químicas do 1,3-propanodiol.**

Fórmula molecular	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>
Massa molar	76,10 g/mol
Ponto de fusão	26,7°C
Ponto de ebulação	214,4°C
Índice de refração, 25°C	1,4386
Densidade, 20°C	1,0526 g/cm <sup>3</sup>
Calor específico	0,53 cal/g.°C
Viscosidade	52 mPa.s
Tensão superficial, 20°C	46,2 dinas/cm
Ponto de fulgor	129°C
Temperatura de auto-ignição	405°C
Pressão de vapor	0,08 mmHg

Fonte: SRI CONSULTING , 2000; DuPont Tate & Lyle BioProducts, acesso em 2012.

Em 2007, as empresas DuPont Tate & Lyle BioProducts iniciaram a produção do 1,3-propanodiol empregando *Escherichia coli* geneticamente modificada. Esta bactéria foi clonada com os genes de *Saccharomyces cerevisiae* responsáveis pela conversão de glicose em glicerol e também receberam os genes de *Klebsiella pneumoniae*, responsáveis pela conversão do glicerol em 1,3-PDO. Desta forma, *E. coli* recombinante passou a produzir 1,3-PDO a partir de glicose de milho, um carboidrato de baixo custo. O 1,3-propanodiol da DuPont recebeu a denominação comercial de Bio-PDO™, cuja fábrica está localizada em Loudon, Tennessee, EUA, sendo a primeira fábrica no mundo a produzir 1,3-PDO em escala comercial a partir de fonte renovável (<http://www2.dupont.com>, acesso em 2012).

O Bio-PDO produzido pela DuPont é encontrado como Zemea™ e Susterra™. O Zemea™ é o 1,3-PDO com maior pureza e menor poder irritante do que outras substâncias, para aplicação em produtos de higiene e cosmético, em substituição ao propileno glicol e ao butileno glicol. O Susterra™ é o 1,3-PDO de grau industrial,

destinado a aplicações como descongelante, anticongelante (<http://www2.dupont.com>, acesso em 2012).

Após o desenvolvimento das rotas químicas economicamente viáveis, para a produção do 1,3-propanodiol em escala industrial, diversas aplicações para este produto continuam sendo implementadas. O 1,3-propanodiol é utilizado na produção de cosméticos, como anticongelante e como fluido térmico, bem como base em soluções para refrigeração de motores que requerem estabilidade em ampla escala de temperaturas (<http://www.duponttateandlyle.com>, acesso em 2012).

Como o 1,3-PDO é um composto bifuncional, pode ser utilizado em muitas aplicações poliméricas, atualmente são empregados outros dióis de baixa massa molecular, tais como o etileno glicol, propileno glicol, 1,3-butanodiol e 1,4-butanodiol (HUANG *et al.*, 2002). E ainda pode ser utilizado na fabricação de resinas de poliésteres, para áreas como a automotiva, engenharia de polímeros, fibras e revestimentos (<http://www.duponttateandlyle.com>, acesso em 2012).

Uma das principais aplicações do 1,3-PDO é a produção do polímero poli(propileno tereftalato) (PPT), também denominado poli(trimetileno tereftalato) ou poli(tereftalato de trimetileno) (PTT), ou ainda 3GT (glicol de 3 carbonos/tereftalato). Após a descoberta do poli(tereftalato de etileno) (PET) por Whinfield e Dickson em 1941, muitos outros poliésteres aromáticos foram sintetizados e estudados. Entre estes poliésteres, o PET e o poli(butileno tereftalato) (PBT) foram produzidos e comercializados há mais de 50 anos, enquanto que o PTT começou a ser comercializado recentemente. O PTT é termoplástico de engenharia, obtido através de reações de condensação entre o 1,3-propanodiol e o ácido tereftálico. O PTT combina a rigidez, resiliência e resistência térmica das resinas PET com a boa processabilidade das resinas PBT. A escassez e o alto custo do 1,3-PDO impediram a produção do PTT em escala comercial. Esta realidade só mudou após o desenvolvimento das rotas químicas para a síntese do 1,3-PDO, possibilitando sua obtenção de forma abundante e a custo industrialmente viável (PANG *et al.*, 2006).

### 2.3 PRODUÇÃO DE 1,3-PROPANODIOL

O 1,3-PDO é obtido comercialmente por duas rotas químicas diferentes, a partir do óxido de etileno e pela acroleína (BIEBL *et al.*, 1999). A produção química do 1,3-PDO geralmente requer alta temperatura, alta pressão e catalisadores de alto custo, além

de gerar intermediários tóxicos e poluentes. Portanto, recentemente tem sido dada muita atenção à produção microbiana do 1,3-PDO, pois este é um processo relativamente simples e que não gera intermediários tóxicos (LIN *et al.*, 2005; KAUR *et al.*, 2012).

### 2.3.1 Produção por via química

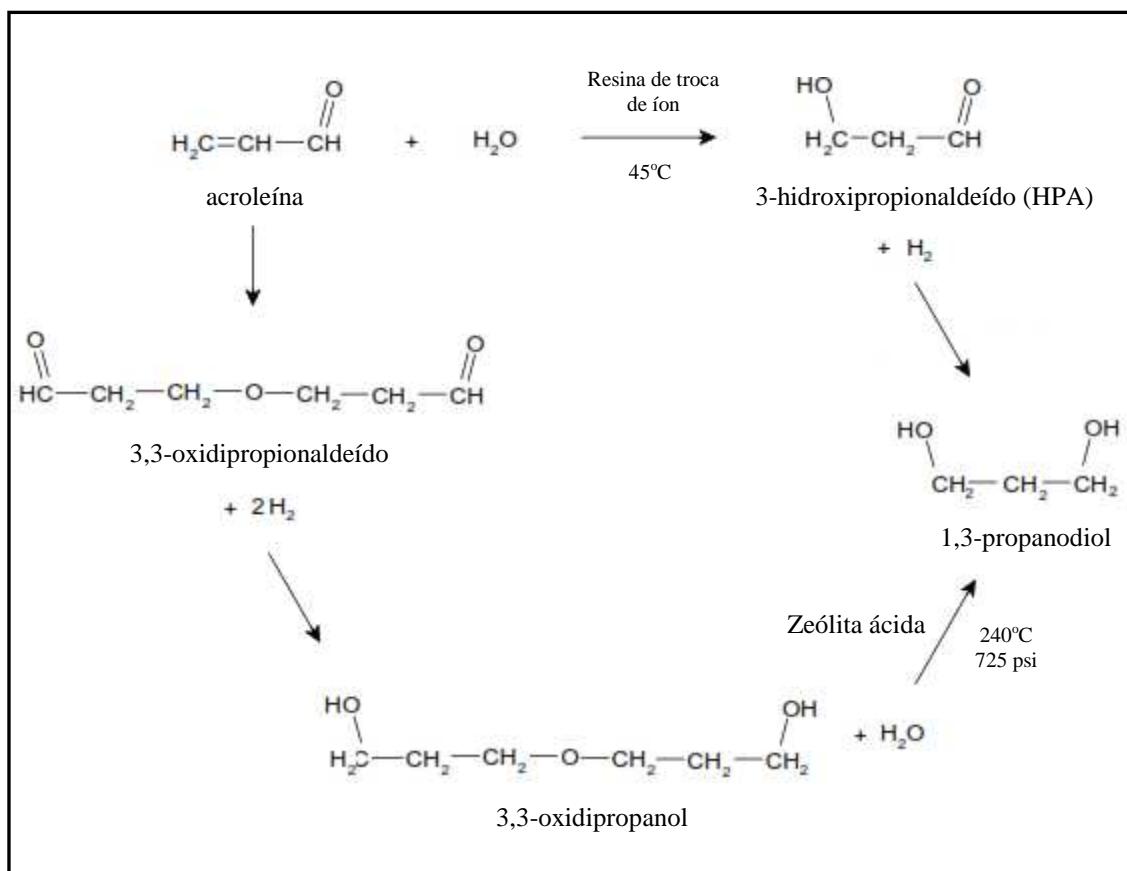
A obtenção do 1,3-PDO por via química pode ser realizada por dois processos, o primeiro a hidratação de acroleína seguido por hidrogenação e o segundo a hidroformilação e hidrogenação de óxido de etileno.

#### 2.3.1.1 Hidratação de acroleína seguido por hidrogenação

Essa rota foi inicialmente explorada pela Shell quando era produtora de acroleína e desenvolvido em um processo comercial pela Degussa. A tecnologia Degussa foi licenciada para DuPont (HAASA *et al.*, 2005). O processo de produção de 1,3-PDO a partir da acroleína é dividido em três etapas. Na primeira etapa, a acroleína reage com água a 45°C na presença de resina trocadora de íons (piridil). A conversão é de 51% em mol com uma seletividade de 83% em mol do intermediário 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA), principal produto. A acroleína que não reagiu é removida em uma coluna de extração e reciclada. Uma solução aquosa de 3-HPA é hidrogenada a 1,3-PDO na segunda etapa. Essa etapa é realizada em um reator de leito fixo a 2.200 psi, com temperatura inicial de 55°C e aquecida até 125°C. O rendimento desta etapa é praticamente 100%. A água é retirada em uma coluna de desidratação na seção de purificação (HAASA *et al.*, 2005).

Um subproduto da hidratação da acroleína, o diéter do 1,3-PDO (3,3-oxidopropionaldeído) é purificado por destilação. No reator de hidrólise, o éter e água reagem a 725 psi e 240°C para produzir 1,3-PDO, que é retornado para a coluna de desidratação para a recuperação do produto (HAASA *et al.*, 2005).

O processo de produção de 1,3-PDO a partir da acroleína está apresentado na Figura 3.

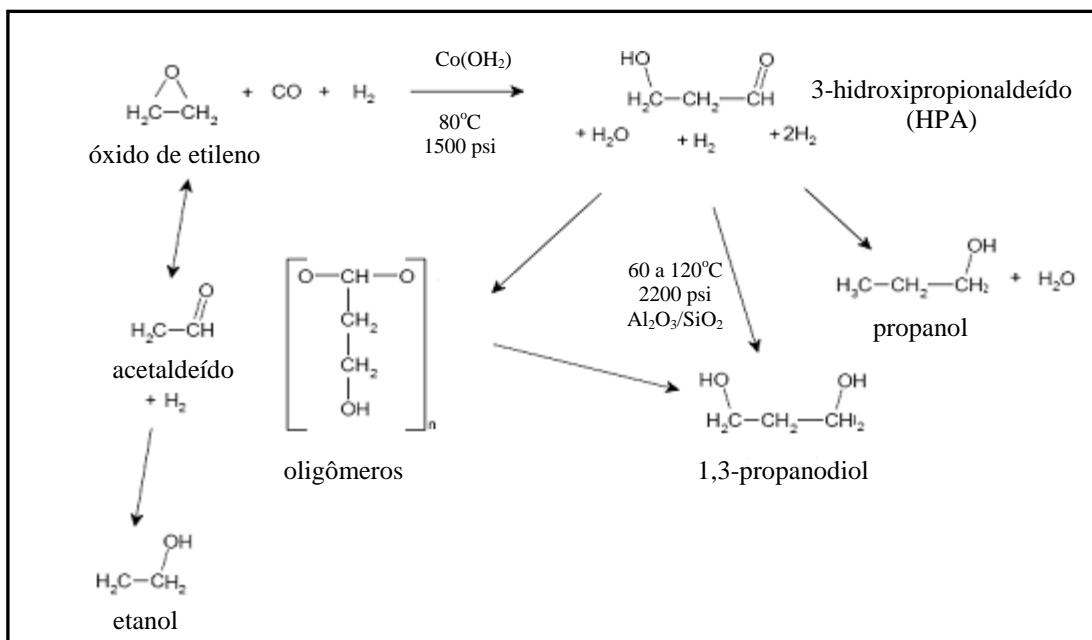


**Figura 3 – Mecanismo para produção de 1,3-PDO a partir de acroleína (Fonte: SRI CONSULTING, 2000).**

#### 2.3.1.2 Hidroformilação e hidrogenação de óxido de etileno

O processo de produção de 1,3-PDO a partir de óxido de etileno (OE) também é dividido em três etapas. Na primeira etapa, o óxido de etileno reage com gás de síntese ( $\text{H}_2/\text{CO}$  com razão molar de 1). Cinco reatores em batelada com agitação são escalonados em um ciclo de 170 minutos. Neste ciclo, a reação ocorre em 80 minutos a 1.500 psi e 80°C. Nesta etapa, a concentração de óxido de etileno é de 10%. O catalisador a base de cobalto é gerado, a partir de  $\text{Co}(\text{OH})_2$  e CO. Dimetildodecilamina é adicionado como um iniciador. Tanto o catalisador quanto o iniciador são insolúveis em água, e são usados para extrair o 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA) em duas colunas. A conversão de OE em 3-HPA é de 85%. Na segunda seção, 3-HPA é hidrogenado a 1,3-PDO em uma série de três reatores, operando a 2.200 psi e em temperaturas progressivamente elevadas de 60°C, 85°C e 120°C. O catalisador de hidrogenação é granular e à base de níquel em um suporte  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ . O rendimento de 1,3-PDO baseado em 3-HPA é 100%. A solução aquosa passa por uma seção de purificação (HAASA *et al.*, 2005).

Na etapa de purificação, o fluxo de 1,3-PDO passa pela primeira coluna. O 1,3-PDO pré-purificado é encaminhado para segunda coluna. O fluxo de resíduo é utilizado para combustível. O rendimento global, baseado no consumo de óxido de etileno é de 85% em mol (HAASA *et al.*, 2005). A Figura 4 detalha essa rota química.



**Figura 4** – Mecanismo para produção de 1,3-PDO a partir do óxido de etileno (Fonte: SRI CONSULTING, 2000).

### 2.3.2 Produção por via biotecnológica

Uma alternativa para substituição da síntese química do 1,3-PDO é a conversão microbiana de carboidratos em 1,3-PDO. Esse método é mais simples e não gera subprodutos tóxicos. Entretanto, a maior limitação para a produção microbiológica em escala industrial do 1,3-PDO tem um custo relativamente alto a partir de um substrato como a glicose. Uma solução atrativa economicamente para este problema é a possibilidade de usar o glicerol cru, proveniente da produção do biodiesel, como substrato nutriente para a fermentação (NAKAMARA e WHITED, 2003; MU *et al.*, 2006).

#### 2.3.2.1 Processo fermentativo a partir do glicerol

A capacidade dos micro-organismos de converterem glicerol em 1,3-PDO foi observada por Noyes e Watkin em 1895. Esses pesquisadores verificaram a presença de

uma impureza em glicerol estocado. A presença de mais de 1% dessa impureza tornou o glicerol inadequado para determinadas aplicações. O início da Primeira Guerra Mundial e a exigência de glicerol de alta pureza para a fabricação de explosivos levou a necessidade de identificação desta impureza de particular importância. Voisenet identificou o composto como 1,3-propanodiol em 1914, que foi determinado como um produto da fermentação anaeróbica de glicerol. Ainda hoje, as especificações do glicerol incluem um teor máximo de 0,5% de 1,3-PDO (ZENG e BIEBL, 2002).

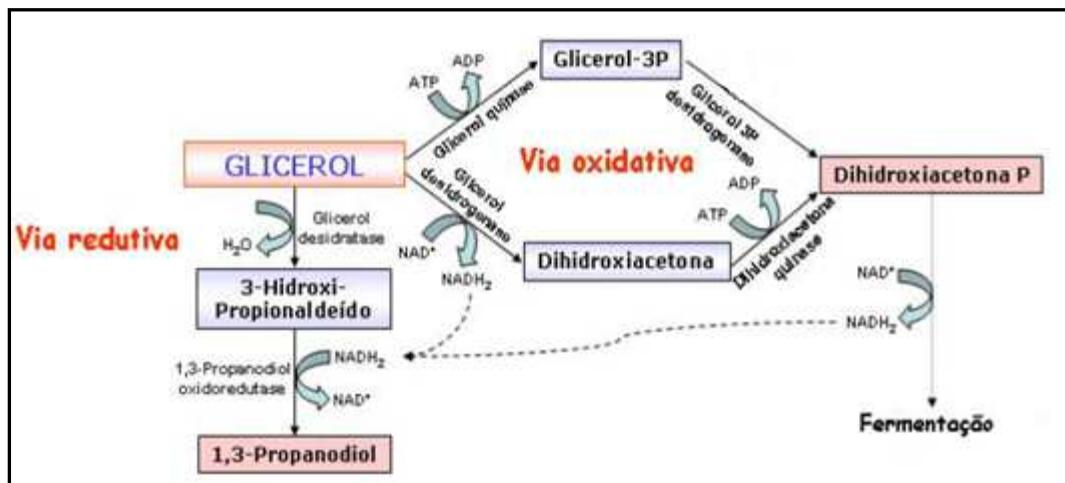
A produção de 1,3-propanodiol por micro-organismos ocorre utilizando exclusivamente o glicerol como fonte de carbono, não se conhecendo quaisquer micro-organismos capazes de converter diretamente açúcares a 1,3-PDO (CAMERON *et al.*, 1998; CELIŃSKA, 2010; DECKWER, 1995; SAXENA *et al.*, 2009).

Existem algumas espécies bacterianas conhecidas que naturalmente produzem 1,3-PDO a partir da fermentação do glicerol, como *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus buchnerii* (DANIEL *et al.*, 1995a,b; SOBOLOV e SMILEY, 1960), *Enterobacter agglomerans* (BARBIRATO *et al.*, 1996a,b; BARBIRATO e BORIES, 1997a; BARBIRATO *et al.*, 1997b), *Citrobacter freundii* (BIEBL e MARTEN, 1995; DANIEL *et al.*, 1995a,b; SEIFERT *et al.*, 2001; SEYFRIED *et al.*, 1996), *Klebsiella pneumoniae* (HUANG *et al.*, 2002; STREEKSTRA *et al.*, 1987; LIN e MAGASANIK, 1960), *Klebsiella oxytoca* (ZHANG *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2006), *Clostridium pasteurianum* (BIEBL e MARTEN, 1995; LUERS *et al.*, 1997; NAKAS *et al.*, 1983), *Clostridium butyricum* (BIEBL *et al.*, 1992; GONZÁLEZ-PAJUELO *et al.*, 2006; HEYNDRICKX *et al.*, 1991; PETITDEMANGE *et al.*, 1995; REHMAN *et al.*, 2008; SAINT-AMANS *et al.*, 2001), *Clostridium acetobutylicum* (FERREIRA *et al.*, 2012).

Quando se analisa a fermentação do glicerol observa-se que os produtos obtidos são os mesmos produzidos durante a fermentação da glicose, como álcool, ácido lático, entre outros. A conversão do glicerol a estes produtos fornece a energia necessária para o crescimento do micro-organismo, e também são liberados equivalentes redutores, que são necessários para a produção do 1,3-PDO (BIEBL *et al.*, 1999).

As reações metabólicas envolvidas na fermentação do glicerol são diversas, mas, em princípio, a fermentação do glicerol pode ser dividida em duas vias, oxidativa e redutora. A via oxidativa é catalisada pelas enzimas glicerol desidrogenase (DhaD), que converte glicerol em dihidroxiacetona (DhaP), e dihidroxiacetonaquinase (DhaK), que fosforila este substrato a dihidroxiacetona fosfato (DhaP); este intermediário é

canalizado para a via glicolítica, gerando ATP e NADH (Figura 5) (SILVA *et al.*, 2009).



**Figura 5** – Esquema do metabolismo do glicerol pelas vias oxidativa e redutiva de alguns micro-organismos (Baseado em AHRENS *et al.*, 1998).

A via redutora (Figura 5) é catalisada pelas enzimas glicerol desidratase (GDHt), que remove uma molécula de H<sub>2</sub>O do glicerol, convertendo-o em 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA), e pela enzima 1,3-propanodiol oxireduktase, que reduz 3-HPA a 1,3-propanodiol, utilizando o NADH<sub>2</sub> (SILVA *et al.*, 2009).

A produção do 1,3-PDO ocorre na via redutora, regenerando os equivalentes redutores (NADH) gerados na via oxidativa, possibilitando desta forma o crescimento microbiano a partir do glicerol, que é um substrato reduzido.

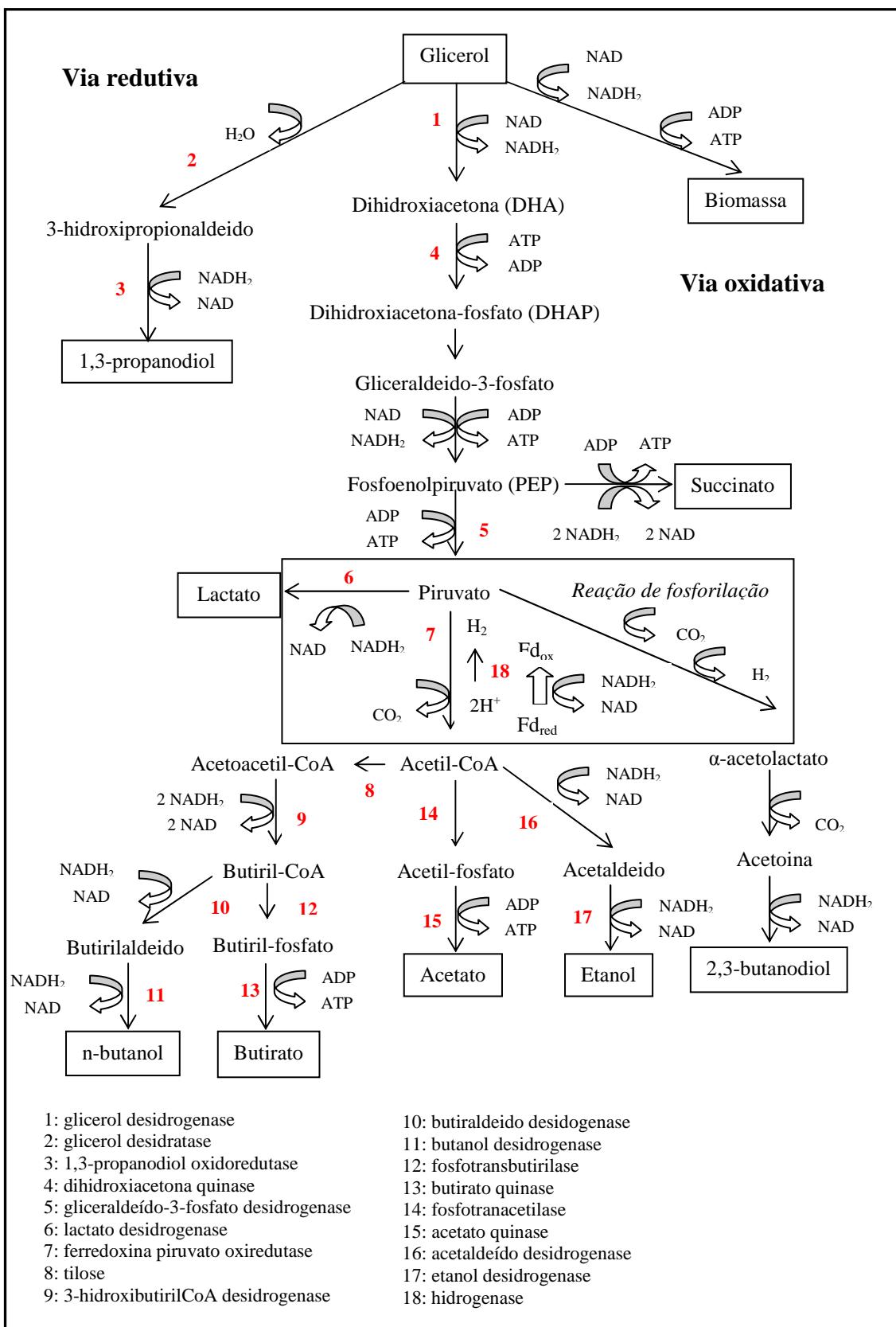
De acordo com Biebl *et al.* (1999), o glicerol é mais facilmente reduzido que o material celular do micro-organismo (assumindo uma composição média da massa celular igual a C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>N). Assim, a formação de biomassa microbiana também gera NADH adicional, o qual pode ser utilizado na produção de mais 1,3-PDO (DECKWER *et al.*, 1999; RIVALDI *et al.*, 2007).

A enzima glicerol desidratase, que converte glicerol a 3-HPA na via redutora, é composta de três polipeptídios ( $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ ) codificados, respectivamente, pelos genes *dhaB*, *dhaC* e *dhaE* (XU *et al.*, 2009). DhaB requer coenzima B<sub>12</sub> (adenosilcobalamina) para catalisar a conversão de glicerol ao seu aldeído correspondente (NAKAMURA e WHITED, 2003; RAYNAUD *et al.*, 2003; TORAYA *et al.*, 1978, 1980). A descoberta de uma DhaB no *Clostridium butyricum*, que é independente da coenzima B<sub>12</sub> foi descrita em 2003 por Raynaud *et al.* Esta descoberta poderia permitir o desenvolvimento de um processo mais econômico para a produção de 1,3-PDO a partir

de fontes renováveis, eliminando a necessidade de adicionar vitamina B<sub>12</sub>, um nutriente de alto custo, ao meio de fermentação. A enzima glicerol desidratase do *Clostridium butyricum* não apresenta qualquer homologia com outras enzimas glicerol desidratase conhecidas, que são todas dependentes da vitamina B<sub>12</sub>. A enzima glicerol desidratase do *Clostridium pasteurianum* apresenta similaridade com a de outros organismos e também requer a vitamina B<sub>12</sub> (MACIS *et al.*, 1998).

Diversas espécies de *Clostridium* fermentam glicerol a 1,3-PDO e ácido butírico como principais produtos da fermentação (PETITDEMANGE *et al.*, 1995; FORSBERG, 1987). Durante a fermentação do glicerol, o *Clostridium pasteurianum* produz grande variedade de produtos, incluindo butanol, etanol, 1,3-PDO, ácidos butírico, acético e lático. Os principais coprodutos da fermentação, tanto em batelada quanto batelada alimentada são butanol e etanol, provavelmente devido ao maior rendimento energético proporcionado pela via oxidativa (FORSBERG, 1987). Em cultura contínua com excesso de nutrientes, o 1,3-PDO é o principal produto da fermentação, sendo o ácido lático o principal coproducto, porém, nesta condição, a produção de biomassa é menor (BIEBL, 2001). Segundo Zeng *et al.* (1994), a preferência por determinada via metabólica depende da fonte do nutriente limitante. Se a fonte de carbono é limitante, será utilizada a via que rende o máximo de energia, ou seja, ácido butírico pelo *Clostridium butyricum* e etanol pela *Klebsiella pneumoniae*, ao invés da via de 1,3-PDO e ácido acético.

A Figura 6 apresenta as principais rotas metabólicas do glicerol aceita por alguns pesquisadores (DECKWER *et al.*, 1995; GIRBAL *et al.*, 1995a; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2008; PAPANIKOLAOU, 2009; ZENG e BIEBL, 2002).



**Figura 6 –** Via metabólica da conversão do glicerol (DECKWER *et al.*, 1999; GIRBAL *et al.*, 1995a; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2008; PAPANIKOLAOU, 2009; ZENG e BIEBL, 2002).

A análise dos produtos da fermentação mostra que parte do glicerol é convertido nos mesmos produtos da fermentação do açúcar. Essa conversão fornece a energia necessária para o crescimento, mas, para muitos produtos, são liberados equivalentes redutores (NAD), que são oxidados em uma conversão redutora de glicerol, levando à formação de 1,3-PDO (BIEBL *et al.*, 1999).

Como pode ser visto na Figura 6 as reações metabólicas envolvidas na fermentação do glicerol são diversas, mas, em princípio, a fermentação do glicerol pode ser dividida em duas vias como citado anteriormenteiva, a via redutiva e a via oxidativa (DECKWER *et al.*, 1999; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2008; PAPANIKOLAU, 2009).

Na via redutiva, o glicerol é primeiramente desidratado a 3-HPA, a reação é catalisada pela coenzima glicerol desidratase (GDHt) B<sub>12</sub>-dependente, que é então reduzido a 1,3-PDO pela 1,3-PDO desidrogenase dependente do NADH<sub>2</sub>. Na fermentação do glicerol pelo *Clostridium butyricum* algumas enzimas desidratases, como GDHt, são descritas como B<sub>12</sub>-independente (MAERVOET *et al.*, 2011).

O rendimento de 1,3-PDO depende da interação e estequiometria das vias redutiva e oxidativa. Tem sido demonstrado que a formação de 1,3-PDO junto com ácido acético, como único subproduto da via oxidativa, resulta no rendimento máximo de 1,3-PDO (BIEBL, 2001). Isso pode ser explicado pelo fato do acetato ser o único subproduto que não utiliza a coenzima NADH<sub>2</sub> para sua formação, gerando um saldo maior de NADH<sub>2</sub> para ser empregado na conversão de 3-hidroxipropionaldeído em 1,3-propanodiol. Na realidade, uma série de outros subprodutos pode ser formada na fermentação, pela via oxidativa, como etanol, ácido lático, ácido succínico e 2,3-butanodiol por enterobactérias como *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* e *Enterobacter agglomerans*; ácido butírico por *Clostridium butyricum* e butanol por *Clostridium pastorianum* (LUERS *et al.*, 1997). Todos estes subprodutos estão associados a uma redução do rendimento de 1,3-PDO (em particular etanol e butanol) que não contribuem para o aumento de NADH<sub>2</sub>, como pode ser observado na Figura 5.

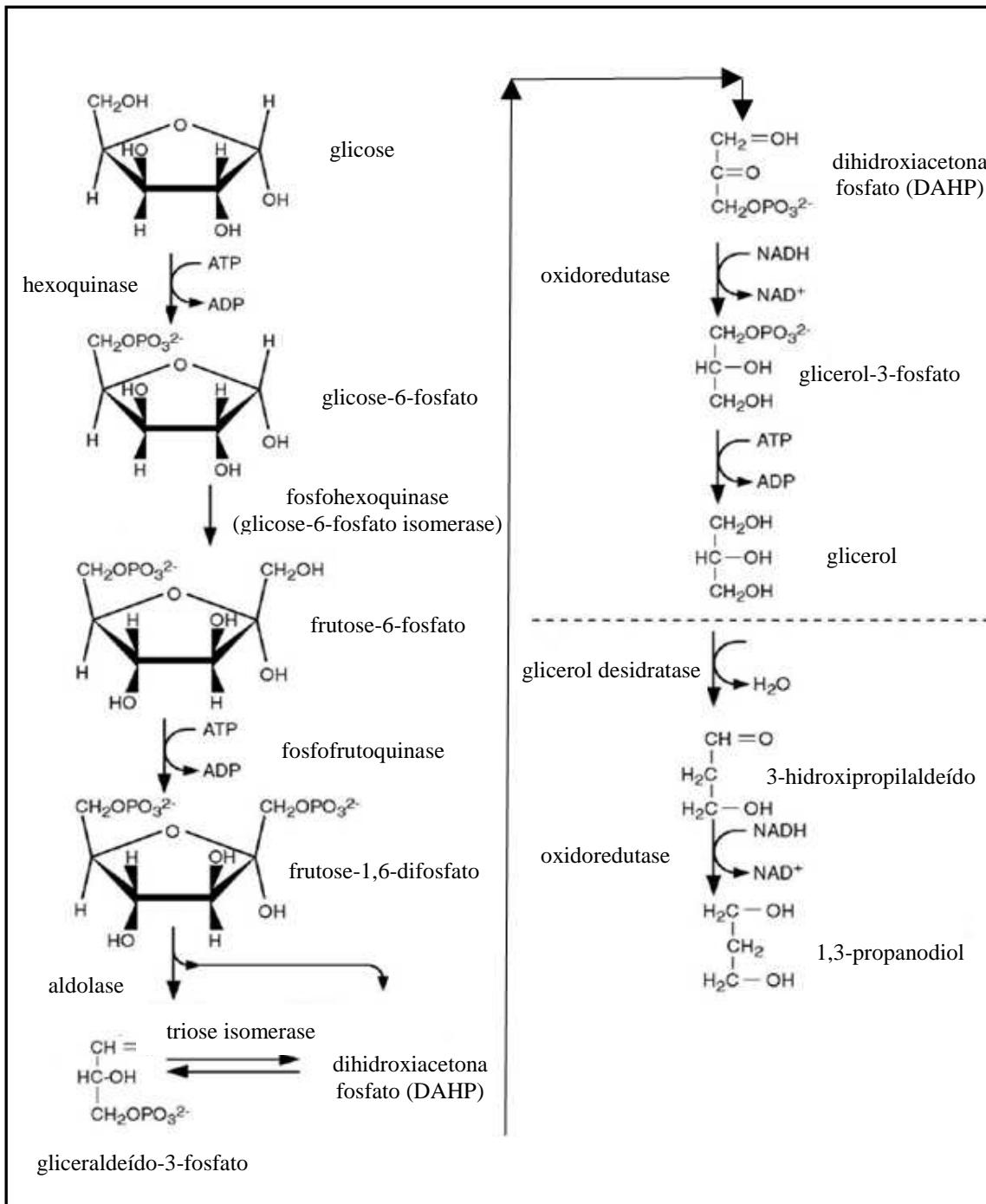
As reações que ocorrem para a formação do piruvato (Figura 5) são comuns aos micro-organismos (BIEBL *et al.*, 1999). O glicerol é desidrogenado a dihidroxiacetona (DHA) com a ajuda da glicerol desidrogenase NAD-dependente o qual é então fosforilado pela dihidroxiacetona quinase (DhaK) a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) um metabólito da via glicolítica. Há uma rede de produção de duas moléculas de NADH<sub>2</sub> e uma molécula de ATP durante a conversão do glicerol a piruvato (CELINSKA, 2010).

Segundo Biebl *et al.* (1999) durante a fermentação do glicerol, as culturas que apresentam maior rendimento em 1,3-PDO são as que produzem somente ácido acético como co-produto, além de CO<sub>2</sub> e de H<sub>2</sub>, ou seja, 64% do glicerol consumido é convertido em 1,3-PDO. Ao contrário, se as duas moléculas de NADH produzidas durante a formação de uma molécula de piruvato são completamente reutilizadas para posterior catabolismo do próprio piruvato, isto é, utilizadas na formação de etanol ou butanol, o rendimento de 1,3-PDO será menor, no entanto, o rendimento em biomassa é maior. O rendimento de 1,3-PDO pode ser ainda melhorado reduzindo-se a produção de H<sub>2</sub> (BIEBL *et al.*, 1999).

### *2.3.2.2 Processo fermentativo a partir da glicose*

Uma técnica para obtenção 1,3-PDO a partir da glicose já é utilizada sob condições anaeróbicas em uma série contínua de fermentadores de leito fluidizado tipo *air-lift*. A produção de 1,3-PDO a partir da glicose é energeticamente desfavorável quando comparada a rota bioquímica de obtenção do 1,3-PDO a partir do glicerol, sendo que ocorre um maior gasto de energia para converter glicose em glicerol e posteriormente em 1,3-PDO, pois esse bioproduto só é obtido a partir do glicerol.

Nessa técnica um micro-organismo recombinante, a *Escherichia coli*, é imobilizado em um suporte de esferas poliméricas. Estas permanecem no interior dos fermentadores, enquanto que o fermentado é filtrado para remover as células em suspensão e outros sólidos. O filtrado segue para um evaporador-cristalizador de dois estágios onde é concentrado na primeira etapa e adicionado alguns sais, principalmente acetato de sódio e bicarbonato de sódio, que são precipitados na segunda etapa e recuperados como sólidos. O vapor obtido na segunda fase do evaporador contendo 1,3-PDO e água é condensado e alimenta uma coluna de remoção de água. O 1,3-PDO bruto obtido no fundo da coluna de remoção de água é bombeado para uma coluna de purificação, sendo recuperado como um produto destilado (SRI CONSULTING, 2000). Essa via bioquímica, da conversão de glicose em 1,3-PDO está representada na Figura 7.



**Figura 7** – Rota enzimática de produção de 1,3-PDO a partir de glicose (SRI CONSULTING, 2000).

#### 2.4 BACTÉRIAS DO GÊNERO *Clostridium*

O *Clostridium* é um gênero de bactéria que tem cerca de 2.700 milhões de anos. Existe desde antes do aparecimento de oxigênio na terra (PINTO, 2009).

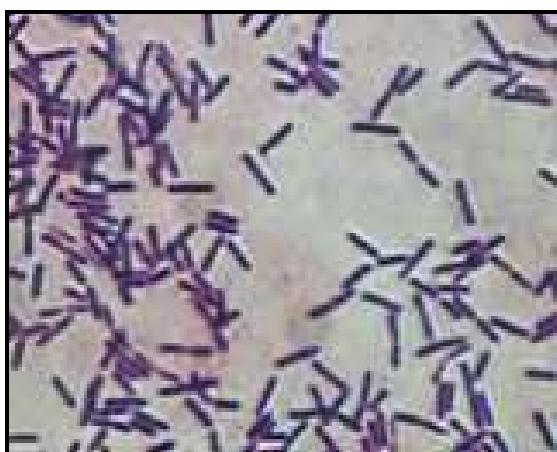
As bactérias deste gênero pertencem família *Clostridiaceae* e apresentam as seguintes características:

- Células em forma de bastonetes com dimensões de 0,3 -2,0 x 1,5 -20 µm;
- Frequentemente estão arranjadas em pares ou cadeias curtas;
- Comumente pleomórficas;
- Gram positivas em culturas jovens;
- Geralmente apresentam motilidade por flagelos peritríqueos;
- A maioria das espécies são quimioorganotróficas, algumas são quimioautotróficas ou quimiolitolíticas;
- Apresentam esporos ovais ou esféricos;
- Usualmente produzem misturas de ácidos orgânicos e alcóois de carboidratos e peptonas;
- Normalmente são catalases negativas e obrigatoriamente anaeróbias, se o crescimento ocorre em presença de ar, é escasso e a esporulação é inibida;
- Metabolicamente são muito diversas, com temperaturas ótimas entre 10-65°C.;
- São encontradas disseminadas no meio ambiente (solo e no trato gastrointestinal de animais e do homem);
- Muitas espécies produzem toxinas potentes e algumas são patógenas aos animais (causam infecções ou feridas ou absorvem toxinas).

As espécies pertencentes a esse gênero incluem *C. butyricum*, *C. butylicum*, *C. beijerinckii*, *C. multvermentans*, *C. iodophilum*, *C. fallax*, *C. tyrobutyricum*, *C. pasteurianum*, *C. amylosaccharobutylypropylcurn*, *C. madisonii*, *C. muelleri*, *C. amylolyticum*, *C. acetobutylicum*, *C. saccharoacetoperbutylicum*, *C. roseum*, *C. aurantibutyricum*, *C. rubrum*, *C. lacto-acetophilume* *C. felsineum* (CUMMINS e JOHNSON, 1971).

A fermentação de açúcares e amido para gerar solventes e combustíveis pode ser considerada um dos processos mais antigos na biotecnologia principalmente na fermentação de etanol para a produção de vinho e cerveja. Depois de tentativas realizadas por Louis Pasteur e outros, a fermentação do amido para produzir acetona, butanol e etanol (fermentação ABE) foi desenvolvida por Chaim Weizman em 1912 (ANDRADE e VASCONCELOS, 2003). Por este motivo, muitas vezes esse micro-organismo é denominado ‘Organismo Weizmann’. Ele isolou a cepa que mais tarde foi chamada de *Clostridium acetobutylicum* e iniciou a primeira planta de produção de acetona pelo amido (WEIZMANN e ROSENFELD, 1937). A Figura 8 mostra a

fotomicrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura do *Clostridium acetobutylicum*.



**Figura 8** – Células de *Clostridium acetobutylicum* observadas por microscopia eletrônica de varredura (Fonte: <http://www.napier.ac.uk>, acesso em 2012).

O *Clostridium acetobutylicum* é um quimio-organotrófico e obtém energia pela oxidação de substratos orgânicos na fermentação. Assim tal como acontece geralmente nas fermentações, o substrato é uma molécula orgânica que age como doador e acceptor de elétrons. Em particular, este exige uma fonte de carboidratos fermentável para seu crescimento e sobrevivência (CATO *et al.*, 1986).

Este micro-organismo é sacarolítico, ou seja, é capaz de degradar açúcares e ainda produzir um grande número de diferentes produtos comercialmente importantes, como acetona, etanol e butanol. São conhecidos por serem micro-organismos clássicos produtores de ácidos e normalmente fermentam a glicose a butirato, acetato, dióxido de carbono e hidrogênio molecular. Estudos prévios das fermentações utilizando culturas puras de *Clostridium* têm recebido bastante atenção, principalmente no campo da produção de solventes (LIN *et al.*, 2005).

Segundo Zhang *et al.* (2007), por não possuir a catalase, uma enzima importante para a desintoxicação celular, quando exposta algumas horas ao oxigênio, esta sofre esporulação como um mecanismo de sobrevivência por longos períodos de tempo neste ambiente. Embora seja um anaeróbio obrigatório, *C. acetobutylicum*, contém algumas enzimas, tal como a enzima superóxido dismutase, que lhe permite sobreviver em ambientes com baixas concentrações de oxigênio. Estas enzimas são reguladas na

presença de oxigênio e contribuem para a sobrevivência da célula por curto prazo de tempo em ambientes com pequena quantidade de oxigênio.

O complexo metabólico da *Clostridium acetobutylicum* tem sido estudado em detalhes nas últimas décadas (BOWLES e ELLEFSON, 1985; MATTA-EL-AMMOURI *et al.*, 1987; VASCONCELOS *et al.*, 1994; GIRBAL *et al.*, 1995a; 1995b) e frequentemente mostra um padrão de fermentação com duas vias metabólicas. Após produzir ácido acético, ácido butírico e hidrogênio, durante a fase de crescimento exponencial, inicia-se a produção de solventes (etanol, acetona e butanol), a qual ocorre bem próxima à fase estacionária. O mecanismo no início da fase de formação de solventes tem sido foco de muitas pesquisas científicas e tem mostrado estar associado ao efeito do pH ácido e tem mostrado estar associado ao efeito do pH ácido (BOWLES e ELLEFSON, 1985; JONES e WOODS, 1986; TERRACCIANO e KASHKET, 1986; GIRBAL e SOUCAILLE, 1994; VASCONCELOS *et al.*, 1994; GIRBAL *et al.*, 1995a).

Na Figura 9 pode ser observada microscopicamente a célula do *Clostridium butyricum*. Seus esporos são ovais, podendo se localizar no centro ou na porção subterminal da célula.

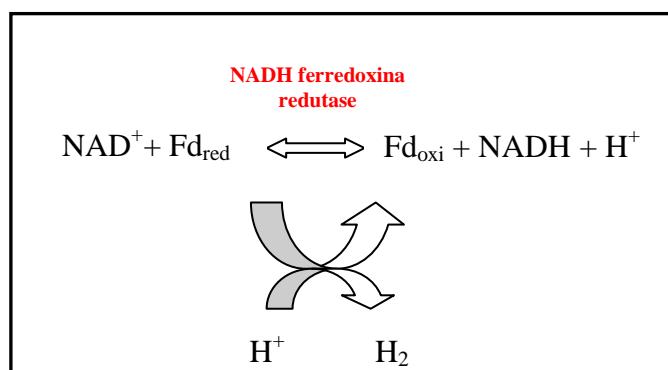


**Figura 9** – Células de *Clostridium butyricum* observadas por microscopia eletrônica de varredura (Fonte: <http://www.miyarisan.com>, acesso em 2012).

O *Clostridium butyricum* apresenta crescimento ótimo numa faixa de pH entre 4,6 e 5,0, após incubação por 5 dias, sendo a temperatura ideal entre 30 e 37°C (algumas amostras podem crescer bem a 25°C e outras a 10°C) (JONES e WOODS, 1986; MOLONGOSKI e KLUG, 1976).

Nessas bactérias a hidrogenase é a enzima que permite usar prótons como receptores terminais de elétrons. A ferredoxina desempenha papel chave no transporte e

na distribuição de elétrons na célula. Em condições apropriadas, a ferredoxina reduzida é capaz de transferir elétrons para o ferro contido na hidrogenase, o que permite o uso dos prótons como um receptor final de elétrons, resultando na produção do hidrogênio molecular. Durante essa etapa, a ferredoxina é reoxidada e o gás hidrogênio é liberado da célula. Outra enzima-chave na distribuição de elétrons é a NADH ferredoxina oxidoreduktase, que atua na oxidação ou na redução do NAD pelo equilíbrio de elétrons entre NAD e ferredoxina (Figura 10).



**Figura 10** – Esquema da produção de hidrogênio pelo *Clostridium butyricum* (Fonte: MUCCILLO, 2007).

Durante o metabolismo do *Clostridium butyricum* na produção de ácidos há um fluxo rápido de elétrons decorrente tanto da quebra do piruvato, quanto da regeneração do NADH por meio da ferredoxina para produzir hidrogênio (JONES e WOODS, 1986).

A conversão de piruvato em acetil-CoA é catalisada pelo complexo de piruvato desidrogenase. Esse complexo é um dispositivo altamente integrado, composto de três classes de enzimas (STRAYER, 1996).

Além da conversão do piruvato para acetil-CoA, o *Clostridium butyricum* pode também converter o piruvato em ácido lático sob determinadas circunstâncias. A via do ácido lático, em condições normais, parece ocorrer somente como alternativa para permitir que a geração da energia e a oxidação do NADH continuem quando os mecanismos para a eliminação dos prótons e elétrons pela geração de hidrogênio molecular são interrompidos. A diminuição da atividade da enzima hidrogenase, é causada pela inibição devida a presença do CO<sub>2</sub>, produzido na conversão do piruvato à acetil-CoA, ou pela ausência de ferro, e assim leva a produção do ácido lático. Este fato

pode ser explicado pelos baixos níveis de ferredoxina e da própria hidrogenase presentes no meio (JONES e WOODS, 1986).

O fluxo de carbono a partir das ramificações do acetil-CoA conduz à formação dos ácidos e dos solventes (álcoois) (Figura 6). Esses pontos de bifurcação podem ocorrer em três metabólitos intermediários: acetil-CoA, acetoacetil-CoA e butiril-CoA. Durante a fase de produção de ácidos, como o ácido acético e o ácido butírico, estes são produzidos a partir do acetil-CoA e butiril-CoA por meio de duas etapas análogas que resultam na produção de acetil-fosfato e butiril-fosfato correspondente, seguidas pela geração de ATP. A butiratoquinase do *Clostridium butyricum* foi observada exibindo atividade reversível (ANDERSCH *et al.*, 1983).

O início da produção de solventes envolve uma interrupção no fluxo de carbono nas vias de produção de ácidos para as vias de produção de solventes. Durante a produção de solventes, o acetil-CoA e a butiril-CoA atuam como intermediários para a produção de etanol e de butanol. Essas vias produzem o acetaldeído e o butiraldeído, respectivamente, como intermediários, e requerem duas dehidrogenases que atuam nas reduções necessárias para produzir etanol e butanol. A redução de butiril-CoA a butanol é mediada pela enzima butiraldeído desidrogenase e pela butanol desidrogenase (ANDERSCH *et al.*, 1983).

Quando o *C. butyricum* cresce em glicerol, este substrato é oxidado a dihidroxiacetona (Dha) e, posteriormente fosforilado para produzir DHha-fosfato, ou então, o glicerol é desidratado a 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA), que em seguida é reduzido a 1,3-propanodiol (1,3-PDO) (ABBAD-ANDALOUSSI *et al.*, 1998). Esta última via ocorre em praticamente todos os micro-organismos produtores de 1,3-propanodiol, onde a desidratação do glicerol a 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA) é catalisada por uma enzima dependente da vitamina B<sub>12</sub> e a redução posterior de 3-HPA a 1,3-PDO é catalisada por uma enzima dependente da coenzima NADH (O'BRIEN *et al.*, 2004), sendo que esta produção de 1,3-propanodiol é associada ao crescimento das células, enquanto que a produção de acetato, butirato e outros produtos não são associados a produção de biomassa (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2000).

Uma grave limitação das enzimas glicerol e diol desidratases dependente da vitamina B<sub>12</sub> é sua rápida inativação diante de elevadas quantidades de glicerol. Essa limitação é superada nos micro-organismos nativos pela presença de enzimas que promovem a troca de enzimas inativadas com novas enzimas ativas pela presença da

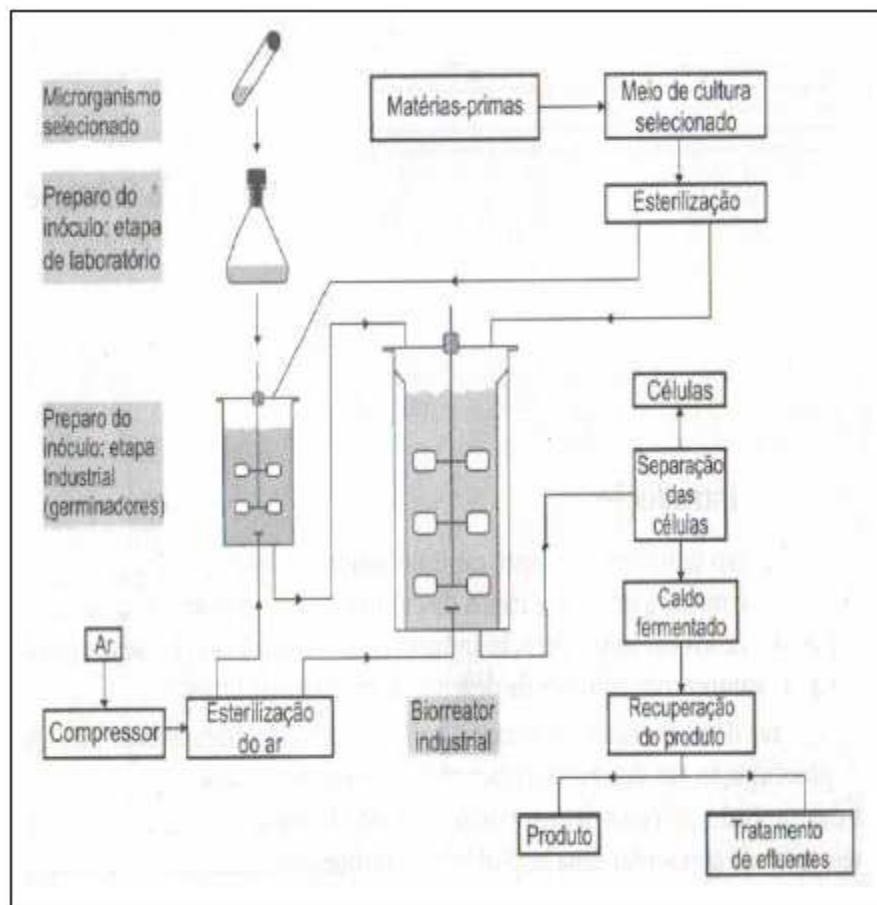
coenzima gerada a partir da vitamina B<sub>12</sub>. Uma alternativa para superar essa inativação da enzima é a adição de quantidade excessiva de vitamina B<sub>12</sub> no meio de cultivo.

Uma grande vantagem da espécie *C. butyricum* é que a glicerol desidratase que atua na conversão de glicerol a 3-HPA é independente da vitamina B<sub>12</sub> (O'BRIEN, 2004).

Em alguns casos, a utilização de cepas de *C. butyricum* mutantes em fermentação em batelada alimentada resultam em um aumento significativo na produção de 1,3-PDO superior a 70 g.L<sup>-1</sup>. A cultura em batelada alimentada pela cepa *Clostridium* sp isolada recentemente (linhagem IK 124) produziu 80,1-87,7 g.L<sup>-1</sup> de 1,3-PDO, sendo esses valores considerados altos quando comparado a outros trabalhos da literatura (AGGELIS, 2009).

## 2.5 MEIO DE CULTIVO

O sucesso de um processo fermentativo depende muito de uma correta definição de quatro pontos básicos: o micro-organismo, o meio de cultura, a forma de condução do processo fermentativo e as etapas de recuperação do produto. Na Figura 11 encontra-se um esquema geral de um processo fermentativo, no qual se destacou alguns pontos essenciais.



**Figura 11** – Esquema geral de um processo fermentativo (Fonte: BORZANI *et al.*, 2001).

De fato, estes quatro pilares de um processo fermentativo interagem enormemente, sendo necessário buscar defini-los de forma conjunta, levando em consideração aspectos biológicos e econômicos, o que torna bastante complexa esta adequada definição.

Sem dúvida, dentre as inúmeras variáveis que interferem num processo fermentativo, o meio de cultivo deve ser destacado, pois é fator determinante para o sucesso do processo. Pirt (1975) classificou os nutrientes de um meio de fermentação, necessários como fonte de energia, nos seguintes grupos: a) fonte dos elementos “principais” – C, H, O, N; b) fonte dos elementos “secundários” – P, K, S, Mg; c) vitaminas e hormônios; d) fontes de “traços” de elementos, ou seja, requerimentos de elementos em quantidades mínimas para o crescimento microbiano (por exemplo, Ca, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Mo).

Na formulação de um meio de cultivo para a fermentação deve-se levar em conta a necessidade desses nutrientes, lembrando que o meio, além de propiciar o

desenvolvimento microbiano, deve favorecer a formação do produto que se deseja (BORZANI *et al.*, 2001). Podem ser adicionados na formulação de um meio de cultivo substâncias que não tem função direta na formação celular, mas que afetam os mecanismos de controle celular, como antiespumantes e estabilizantes (BIRK *et al.*, 1997; GOTO *et al.*, 1998) e tensoativos (MASROOR e CHANDRA, 1989).

A fonte de carbono é um item de extrema importância na formulação de um meio de cultivo. Também tem a função de suprir energia para o anabolismo e manutenção da célula, e cadeia carbônica tanto para a formação de biomoléculas que integram a célula bem como produtos, onde se incluem os peptídeos. Normalmente, o carbono é a fonte limitante de um crescimento microbiano. Sua quantidade no meio de cultivo será função de quanto se deseja aumentar a biomassa do micro-organismo ou produto, levando em conta a relação estequiométrica entre o substrato e a quantidade de produto, embora haja casos em que isso não seja possível, como por exemplo, na produção de toxinas e antibióticos. De uma maneira geral, grande parte dos estudos iniciais para utilização desta fonte refere-se à utilização de substratos mais simples como açúcares, ácidos e álcoois em meios quimicamente definidos. O uso de fontes de carbono mais simples se deve, em parte, ao fato da maioria dos micro-organismos estudados não fermentarem polímeros e a maior facilidade em elucidar vias bioquímicas e/ou controles envolvidos na formação do produto (TONG e BAJENDRA, 1992; HAYASHI *et al.*, 1993; LEE *et al.*, 1999).

Se por um lado concentrações mais elevadas de substrato podem levar a uma concentração celular maior, em função de maior suprimento energético e de cadeia carbônica para a formação de nova célula, por outro lado, a produção de peptídeo pode ocasionar repressão catabólica, fato comum na formação de diversos produtos sintetizados tanto por fungos como bactérias. Também se sabe que a partir de uma determinada concentração da fonte de carbono, que decresce no decorrer da fermentação, esse efeito de repressão deixa de existir, havendo a liberação da formação do produto. Assim, o estudo da concentração inicial da fonte de carbono tem uma importância fundamental no desenvolvimento de um meio de cultivo (BIRK *et al.*, 1997; GOTO *et al.*, 1998).

Outro elemento de suma importância numa formulação de meio de cultivo é o nitrogênio. É ele que fornece o grupo amino para moléculas que o contenham em sua estrutura, incluindo os ácidos nucleicos e aminoácidos e, portanto, interfere efetivamente no crescimento celular e formação dos peptídeos. Também para este

elemento há estudos visando o uso de fontes quimicamente definidas, como por exemplo, nitratos, sais de amônio, ureia, amônia, etc. (KUNDU e DAS, 1970; TONG e BAJENDRA, 1992; ZHEREBTSOV e NASONOVA, 1989), ou complexas tais como, água de maceração de milho, extrato de levedura, farinha de peixe, farelo de amendoim desengordurado, entre outras (GREASHAM, 1993), que além de fornecer o nitrogênio propriamente dito, pode suprir o meio também com vitaminas, aminoácidos e sais.

Um procedimento muito utilizado para a otimização de processos fermentativos é a avaliação estatística dos parâmetros que afetam o processo através do planejamento experimental. Em um processo de otimização de um meio de cultivo normalmente são avaliadas as fontes orgânicas (incluindo grande parte das fontes complexas) e as inorgânicas (HAYASHI *et al.*, 1993; PANDEY *et al.*, 1994; RAMACHANDRAN *et al.*, 1979; SINKAIR e LEWIS, 1980).

Box *et al.* (1978) descrevem o planejamento experimental como sendo uma estratégia para otimização simultânea de diversas variáveis independentes, com possibilidade de determinar o ponto ótimo num processo com um número reduzido de experimentos, comparando aos métodos tradicionais, propiciando uma economia de tempo e recursos.

## 2.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental é uma análise estatística diferencial para planejar criteriosamente e determinar às condições otimizadas mais rapidamente, a um menor custo e com o suporte estatístico na discussão dos resultados (RODRIGUES e IEMMA, 2009). A grande vantagem da utilização dessa técnica é a redução do número de experiências ou repetições e melhoria a qualidade da informação obtida através dos resultados. Isto significa uma sensível diminuição do trabalho e, consequentemente, do tempo e do custo final. Um tempo maior de estudo do planejamento do processo e das variáveis envolvidas, coletando informações na literatura, garantirá uma melhor estratégia para a realização dos ensaios que agregará melhor qualidade aos resultados obtidos (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

O planejamento experimental é um dos campos de estudo da quimiometria muito empregada em pesquisas científicas e na indústria (BARROS NETO *et al.*, 2001). Esta ferramenta estatística permite o estudo de diferentes variáveis simultaneamente,

minimizando o número de ensaios, tempo e custo, o que não acontece com a otimização univariada, na qual se avalia um fator de cada vez (PERALTA-ZAMORA *et al.*, 2005).

A maioria dos estudos na área de bioprocessos envolve o entendimento do mecanismo de produção, para selecionar o melhor biocatalisador (micro-organismo ou enzima), as melhores condições físico-químicas que propiciam um melhor rendimento e produtividade em função de recursos mais econômicos, mas que ainda produzam um rendimento satisfatório. O estudo de um processo fermentativo envolve também o desenvolvimento de uma estratégia de otimização, obtendo-se assim um melhor rendimento do produto. A otimização pode ser feita ajustando várias etapas do processo, sendo algumas delas mais facilmente modificadas do que outras.

O substrato pode ser modificado de forma a fornecer de maneira ótima e econômica os nutrientes necessários para o crescimento e a produção de metabólitos. No entanto, essa mudança deve respeitar a fisiologia do micro-organismo e suas necessidades nutricionais e físico-químicas. O meio de cultivo também pode ser modificado de forma a induzir um tipo de produção no micro-organismo. Por exemplo, quando se deseja produzir biomassa, é necessário fornecer elementos que favoreçam o crescimento, como a aeração, mas no caso da produção de um metabólito específico, é necessário fornecer substratos que favoreçam determinada via e reprimam a produção de metabólitos indesejáveis. A determinação da concentração adequada de substratos e o tipo utilizado podem implicar na realização de muitos experimentos. Para auxiliar nesse caso, são utilizadas ferramentas estatísticas de planejamento experimental e análise de dados.

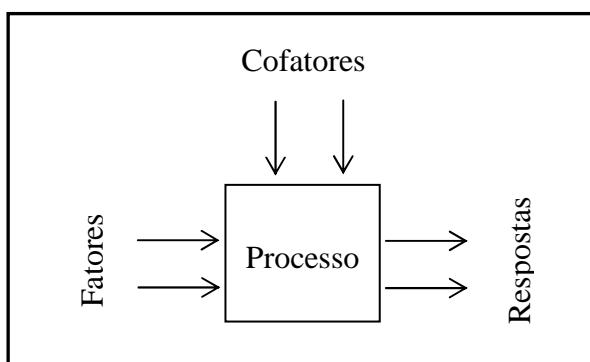
As condições operacionais do processo envolvem a aeração, o controle do pH, a temperatura e a agitação. Estas podem ser todas controladas dentro de um biorreator, e é necessário determinar a condição ótima para cada micro-organismo.

Os parâmetros que podem ser modificados e necessitam de um planejamento experimental amplo e análise estatística são o substrato e as condições operacionais. Por exemplo, no caso da seleção de um substrato ótimo, além da escolha do tipo de substrato empregado, é necessário determinar o nível ou quantidade utilizada.

Um bom planejamento consiste em projetar o experimento eficaz construindo planos de trabalho que sejam capazes de fornecer exatamente o tipo de informação que se procura e que os dados obtidos possam ser analisados para produzir conclusões válidas e objetivas. O planejamento deve maximizar a quantidade de informação que

pode ser obtida, a partir de uma dada quantidade de experimentos (CALLEGARE, 2001; ARAÚJO e BRERETON, 1996).

Para isso, é preciso conhecer primeiramente o que se deseja determinar e quais os fatores que influenciam a variável independente. O delineamento dos objetivos e a seleção dos fatores envolvidos no processo são feitos geralmente com um modelo de processo do tipo “black box” (Figura 12). O referido modelo relaciona as variáveis discretas, as variáveis contínuas, os fatores que podem ser controlados e aqueles que não podem ser ajustados. Cada um dos fatores que podem ser variado e pode gerar ou não um resultado diferente (CALLEGARE, 2001; ARAÚJO e BRERETON, 1996).



**Figura 12** – Definição dos fatores envolvidos  
(Fonte: NIST / SEMATECH, 2011).

O micro-organismo pode ser modificado através de técnicas de melhoramento de cepas. Espécies encontradas na natureza normalmente não produzem grandes quantidades de metabólitos, e por isso muitas vezes é necessário melhorar essa produção para poder aplicá-la em escala industrial através da seleção de variantes naturais, quando terá exposição de micro-organismos a agentes mutagênicos, ou da introdução de material genético recombinante.

### 2.6.1 Método de Plackett-Burman (PB)

Os delineamentos experimentais de Plackett & Burman (PB) são eficientes em situações que envolvem uma grande quantidade de variáveis a serem exploradas. Em situações com até 8 variáveis independentes por exemplo, os planejamentos fracionários são bem capazes de resolver. Em experimentos que envolvem um número superior de variáveis independentes, utiliza-se Plackett & Burman (RODRIGUES e IEMMA, 2009). Esse método foi desenvolvido pelos pesquisadores Plackett e Burman em 1946.

Esta técnica permite a avaliação de N-1 variáveis em N experimentos. Esse valor de N deve ser um múltiplo de 4 (4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 até 100).

Quando se começa a trabalhar com um novo sistema, um problema comum a ser resolvido é a determinação da influência de uma ou mais variáveis sobre algumas variáveis de interesse. Ou seja, deseja-se conhecer como as respostas são influenciadas por diferentes fatores. Para fazer uma triagem inicial dos fatores é vantajoso começar pela execução de um planejamento fatorial incompleto, o chamado fatorial fracionário (BARROS NETO *et al.*, 2001), já que o número de ensaios necessários para a execução de um planejamento fatorial<sup>2</sup> completo aumenta rapidamente com k, o número total de fatores investigados. O planejamento Plackett & Burman é um tipo de planejamento fatorial fracionário que permite o teste de múltiplas variáveis independentes do processo com apenas um número pequeno de ensaios, em vez de usar planejamentos fatoriais completos.

A Tabela 3 apresenta um exemplo literal de um planejamento do tipo Plackett-Burman para sete variáveis, de A até G em dois níveis, alto (H) e baixo(L). Normalmente, três variáveis são suficientes para uma estimativa adequada do erro. No entanto, podem ser utilizadas uma quantidade maior se o número de experimentos não for muito grande.

**Tabela 3 – Planejamento Plackett-Burman.**

Ensaios	Variáveis						
	A	B	C	D	E	F	G
1	H	H	H	L	H	L	L
2	L	H	H	H	L	H	L
3	L	L	H	H	H	L	H
4	H	L	L	H	H	H	L
5	L	H	L	L	H	H	H
6	H	L	H	L	L	H	H
7	H	H	L	H	L	L	H
8	L	L	L	L	L	L	L

H: nível maior; L: nível menor

Fonte: STANBURY, 1995.

Na Tabela 3 cada linha horizontal representa um experimento e cada coluna representa o nível em que um único fator se encontra em cada experimento. Para os níveis de cada fator foi utilizada a denotação H para alto e L para baixo, mas pode-se também utilizar para a mesma finalidade +1 para alto e -1 para baixo. O intervalo escolhido entre esses dois níveis deve ser suficientemente grande para garantir que o

ponto ótimo esteja dentro deste intervalo, mas deve-se ter cuidado com variáveis muito sensíveis, pois um intervalo muito grande poderia mascarar as outras variáveis.

Geralmente os planejamentos são aplicados em sequência, exatamente na ordem descrita na tabela dos ensaios. A aplicação sequencial dos mesmos implica em obtenção dos melhores resultados de uma para a execução do outro, isto é, os melhores resultados do planejamento do método Plackett & Burman são aplicados no método fatorial fracionário e os melhores resultados deste são aplicados no método de superfície de resposta, gerando a validação ou não do método.

No trabalho de Costa (2010) foi utilizado um planejamento experimental do tipo Plackett & Burman para avaliar os melhores nutrientes e condições de operação para a produção de hidrogênio a partir da fermentação do glicerol bruto pelo lodo (consórcio microbiano) obtido de uma estação de tratamento de esgoto. Neste planejamento foram usadas oito variáveis, com 20 ensaios e 4 repetições no ponto central. A aplicação do planejamento experimental permitiu a proposição de um modelo para trabalhar em condições otimizadas de fermentação, elevando a produção de hidrogênio de 29,8 para 44,9 % mol de H<sub>2</sub>.

## 2.7 ESTUDO CINÉTICO

Modelos cinéticos são ferramentas utilizadas na engenharia, que podem auxiliar na previsão do crescimento microbiano a partir da melhoraria e controle da fermentação. Muitos modelos não estruturados, no qual o material celular é representado por uma única variável (massa celular ou número de células) de culturas bacterianas são descritos na literatura, para descrever o comportamento cinético do processo (BORZANI *et al.*, 2001; GÜNZEL *et al.*, 1991). Porém na literatura não foi encontrado nenhum trabalho sobre o estudo cinético de crescimento celular e consumo de substrato para a produção do 1,3-PDO utilizando o *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259.

Alguns modelos cinéticos foram propostos para descrever os efeitos das concentrações do substrato sobre a taxa de crescimento da biomassa. O substrato geralmente é um carboidrato que atua como fonte de carbono e de energia para o metabolismo do micro-organismo e produção de biocompostos, como o 1,3-propanodiol. Entre os modelos existentes o modelo de Monod, (Equação 1) é considerado um clássico e tem sido largamente utilizado.

O objetivo do estudo cinético de processos fermentativos é quantificar a taxa de crescimento celular, consumo de substrato, formação de produtos e demais parâmetros relacionados, além de avaliar a influência de fatores externos como pH, temperatura, inibidores, etc.

A complexidade da descrição cinética que é requerida e apropriada depende das situações físicas e da aplicação pretendida. Não é possível a formulação de um modelo que inclua todas as características e detalhes celulares. O modelo deve ser formulado a partir de algumas aproximações (STREMEL, 2001).

Como a concentração microbiana aumenta durante um cultivo descontínuo, tendo como consequência a elevação da concentração do complexo enzimático responsável pela transformação do substrato em produto, é mais conveniente analisar os valores das velocidades instantâneas que estão representada nas Equação 1 e 2 (BORZANI *et al.*, 2001).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_x \cdot X \quad (1)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\mu_s \cdot X \quad (2)$$

Na fase de crescimento denominada de logarítmica ou exponencial onde a velocidade específica de crescimento ( $\mu_x = \mu_m$ ) é constante e máxima. Nessas circunstâncias, a Equação 1 permite concluir que a velocidade de crescimento é diretamente proporcional à concentração X, de acordo com a Equação 3.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m \cdot X \quad (3)$$

A equação de Monod interpreta a fase exponencial de crescimento e é comumente empregada para explicar a relação entre a concentração do substrato (S) limitante no meio de cultivo, com a velocidade específica ( $\mu_x$ ) de reprodução do micro-organismo, sendo expressa matematicamente pela Equação 4.

$$\mu_x = \frac{\mu_m \cdot S}{K_s + S} \quad (4)$$

Sendo  $\mu_m$  a máxima taxa de crescimento celular,  $S$  a concentração do substrato limitante e  $K$  a constante de Monod, que representa o valor de substrato no qual a taxa específica de crescimento é a metade do seu valor máximo. Componentes presentes em altas concentrações no meio de cultura não afetam significativamente a taxa de crescimento celular segundo esse modelo, ou seja, a equação de Monod somente se aplica para casos em que não há presença de inibidores de crescimento no meio de cultura (BAI *et al.*, 2008).

Como a concentração microbiana aumenta durante o cultivo descontínuo, há um consumo de substrato, que é utilizado pelo metabolismo microbiano para produzir o produto. Dessa forma, é mais coerente analisar as velocidades instantâneas de consumo de substrato e formação do produto com relação à concentração microbiana, ou seja, relacionado-as a um valor de  $X$  em um dado instante (BORZANI *et al.*, 2001), passando a denominadas velocidades específicas de consumo de substrato e formação de produto.

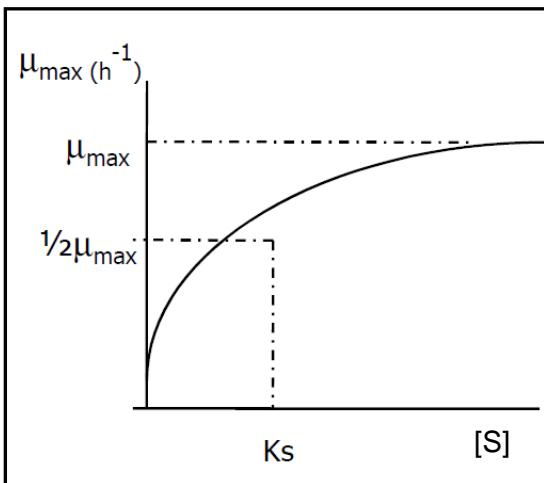
Para Neto (1999), o estudo cinético de um determinado fenômeno ou processo, significa avaliar sua evolução no tempo, através da quantificação de certas grandezas que definem adequadamente esta evolução. No caso da degradação de material orgânico, as grandezas medidas são: tempo, concentração de micro-organismos presentes, concentração de substrato que limita o processo e a concentração do produto em que se possa estar interessado.

A cinética bioquímica de um determinado processo consiste em estudar as velocidades de crescimento dos micro-organismos acompanhadas da utilização de substrato e da formação de produtos. Foresti *et al.* (1999) relatam que as velocidades devem ser expressas em termos matemáticos por modelos que representem com clareza a eficácia dos processos. O conhecimento de parâmetros cinéticos é de extrema importância para modelagem de um processo bioquímico, permitindo-se avaliar as velocidades de utilização de substrato, de formação de produtos e de crescimento da biomassa nas condições estabelecidas (ZAIAT e FORESTI, 1997).

Barford e Hall (1978) citado por Dawson (1985) avaliaram a modelagem matemática do crescimento microbiano e concluíram que o modelo Monod ainda é o melhor exemplo na formulação de um modelo matemático para descrever o crescimento microbiano. No entanto, é importante considerar que este modelo se baseia em premissas simples, e é importante reconhecer estas limitações inerentes ao modelo. O modelo Monod relata o crescimento em um meio simples e definido para a concentração de um nutriente limitante, sob condições ambientais constantes. Também

assume que os micro-organismos se desenvolvem de uma maneira uniforme (sob condições de crescimento balanceado). Nestas condições, o crescimento é descrito por uma única variável, um único passo de uma reação com estequiometria restrita, de tal modo que o rendimento seja constante (DAWSON, 1985).

Se somente um substrato é limitante, a mudança da concentração deste é relevante e a cinética de crescimento varia tipicamente numa forma hiperbólica (BORZANI *et al.*, 2001). A Figura 13 mostra o comportamento da velocidade específica em função da concentração do substrato.



**Figura 13** – Representação da velocidade específica em função da concentração do substrato (Fonte: BORZANI *et al.*, 2001).

A baixa da constante de saturação implica numa maior duração da fase exponencial. Nesta fase, a taxa de crescimento é proporcional à concentração de células X. Tomando como exemplo um crescimento microbiano num regime em batelada e que obedece à cinética de Monod, a fase exponencial pode ser escrita pelas equações de primeira ordem (Equação 5 e 6).

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_m \cdot S \cdot X}{K_S + S} \quad (5)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} \quad (6)$$

Igualando as Equações 5 e 6 obtem-se a taxa de consumo de substrato sem considerar o produto formado como descrita pela Equação 7.

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu_m \cdot S \cdot X}{Y_{X/S}(K + S)} \quad (7)$$

Os parâmetros do modelo cinético foram determinados a partir da integração das Equações (5) e (7) e assim obtendo a Equação 8.

$$X = X_0 + Y_{X/S}(S_0 - S) \quad (8)$$

Substituindo a Equação 8 em 7 obtem-se,

$$\frac{K + S}{S[X_0 + Y_{X/S}(S_0 - S)]} dS = -\frac{\mu_m}{Y_{X/S}} dt \quad (9)$$

Integrando a Equação 9 obtemos a equação da reta,

$$Z = aU + b \quad (10)$$

Com

$$Z = \frac{\ln \frac{S}{S_0}}{t} \quad (11)$$

$$U = \frac{\ln \left[ 1 + \frac{Y_{X/S}}{X_0} (S_0 - S) \right]}{t} \quad (12)$$

$$a = 1 + \frac{X_0 + Y_{X/S} S_0}{Y_{X/S} K} \quad (13)$$

$$b = \frac{\mu_m (X_0 + Y_{X/S} S_0)}{Y_{X/S} K} \quad (14)$$

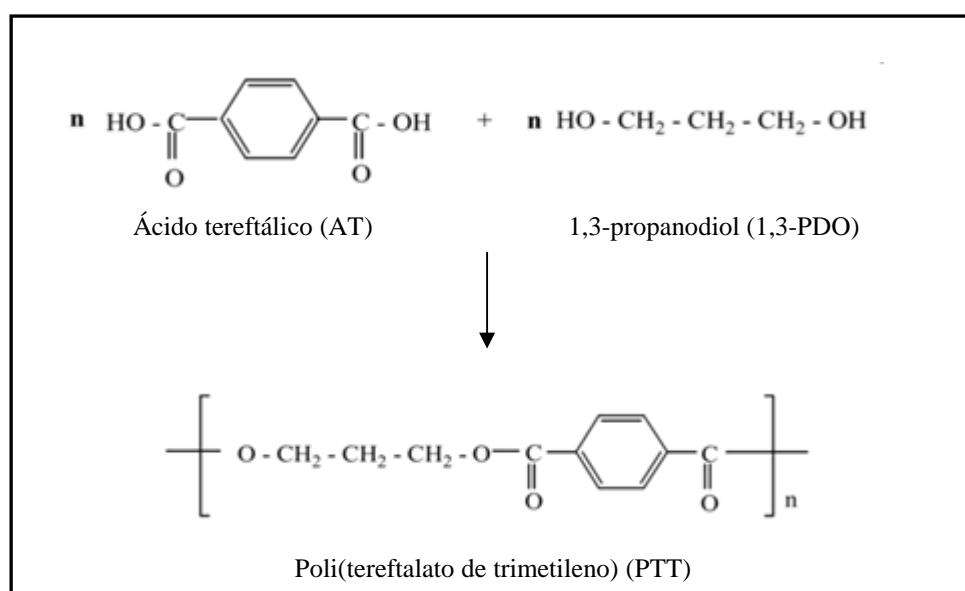
Os parâmetros do modelo foram estimados nos dados experimentais e puderam ser ajustados de acordo com a Equação 10, com  $Y_{X/S}$  inicialmente determinado de acordo com a Equação 15.

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (15)$$

Onde  $X$  e  $X_0$  representam as concentrações final e inicial de biomassa, respectivamente e  $S_0$  e  $S$  são as concentrações inicial e final de glicerol, respectivamente.

## 2.8 POLI(TEREFTALATO DE TRIMETILENO) – PTT

O 1,3-PDO é um composto químico valioso que é principalmente utilizado na síntese do poli(tereftalato de trimetileno) - PTT pela polimerização com tereftalatos (PAGLIARO *et al.*, 2007). O PTT é produzido a partir da condensação entre 1,3-propanodiol e ácido tereftálico (Figura 14). Em 1995, a Shell apresentou o polímero Corterra®, denominação comercial do PTT, criando uma demanda pelo 1,3-PDO. O PTT faz parte do grupo dos poliésteres como os polímeros poli(etileno tereftalato) - PET, produzido a partir do etileno glicol, e ao poli(butileno tereftalato) - PBT, produzido a partir do 1,4-butanodiol (CAMERON *et al.*, 1998).



**Figura 14** – Produção do poli(tereftalato de trimetileno) - PTT a partir da reação entre o ácido tereftálico (AT) e 1,3-propanodiol (1,3-PDO).

As propriedades físico-químicas do PTT o tornam um polímero com melhores propriedades do que polímeros produzidos a partir de 1,2-propanodiol, butanodiol ou etileno glicol (HIMMI *et al.*, 1999), como o PBT e o PET. Uma característica diferencial que confere propriedades únicas ao PTT é o número ímpar de carbonos do 1,3-PDO (CAMERON *et al.*, 1998), diferentemente do PET e do PBT que contêm número par de carbonos. Por exemplo, o PTT apresenta melhor resiliência, maior facilidade de tingimento e melhores propriedades elásticas. Ainda, o PTT é resistente à descoloração (lavagens sucessivas) e a carga estática, podendo ser utilizado em áreas tão distintas como carpetes, vestuário, têxtil, termoplásticos de engenharia e monofilamentos. Para aplicações na indústria de vestuários, as características que fazem do PTT um polímero interessante incluem maciez, elasticidade e coloração duradoura. Como o PTT pode substituir o PET e o nylon em suas diversas aplicações, a Tabela 4 resume uma comparação entre as propriedades principais desses polímeros.

**Tabela 4** – Características das resinas poli(tereftalato de etileno), nylon e poli(tereftalato de trimetileno).

PROPRIEDADES	PET	Nylon	PTT
Elasticidade	Razoável	Excelente	Excelente
Tingimento	Bom	Ruim*	Muito bom
Resistência a sujar/manchar	Excelente	Ruim	Excelente
Cargas estáticas	Baixa	Alta	Baixa
Resistência à abrasão	Excelente	Excelente	Excelente

\*O nylon apresenta excelente tingimento, mas com um número muito limitado de cores, não podendo ser tingido com dispersões mais elaboradas.

Fonte: SRI CONSULTING, 2000.

### 2.8.1 Produção comercial de PTT

A produção comercial do PTT iniciou-se por volta de 1995 com as empresas Shell e DuPont. Contudo, a capacidade de produção das fibras de PTT ficou dependente da disponibilidade do monômero 1,3-PDO, tendo em vista que o outro monômero, o ácido tereftálico, já era comercializado em grande escala a muitos anos.

A primeira planta produtora do poli(tereftalato trimetileno) - (Corterra®) em escala comercial, com capacidade para produzir 95.000 toneladas por ano, foi a Poly Canada, localizada em Montreal e inaugurada em 2004, uma *joint venture* entre a Shell Chemicals Canada Ltd. e a Société Générale de Financement du Quebec. Esta empresa encerrou suas atividades definitivamente em março de 2009, devido à redução de

demandada provocada pela crise econômica mundial (<http://www.newswire.ca/en/releases/archive/March2009/03/c5216.html>, acesso em 2012). No final de 2009, a Poly Canadá foi adquirida por um grupo português, visando adaptar a fábrica para a produção de PET tradicional (<http://www.newswire.ca/en/releases/archive/December2009/09/c9468.html>, acesso em 2012). Apesar de inicialmente esta informação parecer desfavorável à indústria do 1,3-PDO, é importante ressaltar que o 1,3-PDO produzido pela Shell, para a produção do Corterra®, utiliza o óxido de etileno derivado do petróleo, o que encarece o produto final. Deste modo, o desenvolvimento de vias fermentativas para a obtenção do 1,3-PDO poderá torná-lo mais competitivo em relação ao 1,3-PDO derivado de fonte fóssil.

A DuPont produz o PTT sob a denominação comercial Sorona®, em Decatur, Illinois (EUA), utilizando o 1,3-PDO produzido a partir da fermentação de glicose de milho (SAXENA *et al.*, 2009) empregando a *Escherichia coli* recombinante. Inicialmente a DuPont produzia 1,3-PDO a partir da hidratação da acroleína e a Shell a partir da hidroformilação do óxido de etileno (OE). Embora ambos os processos sejam comerciais, a via OE gera um produto final mais competitivo (SRI CONSULTING, 2000).

Em 2006, a DuPont iniciou a produção de 1,3-propanodiol por uma nova rota, um bioprocesso utilizando um micro-organismo modificado geneticamente capaz de converter açúcar de milho no diol de interesse, sendo conhecido como Bio-PDO®. A unidade de produção do Bio-PDO® foi instalada em Loudon, uma cidade do estado norte americano do Tennessee com capacidade de 45.000 toneladas por ano. Em maio de 2010, a DuPont anunciou a ampliação de sua unidade de Bio-PDO® em 35% da produção, prevendo que em junho de 2011 a unidade estaria operando com a capacidade almejada. A expansão foi impulsionada pela forte demanda, segundo a DuPont. Seu produto a base de milho é utilizado como um ingrediente que é empregado desde cosméticos até formulações de fluidos de perfuração e polímeros, incluindo o polímero de fontes renováveis Sorona DuPont. O Bio-PDO® é comercializado através das marcas Zemea® e Susterra® (ICIS GREEN CHEMICALS, 2010).

Em 2007, a DuPont começou a fornecer para a Terra Naturals seu inovador produto Zemea®, propanodiol produzido a partir de fontes renováveis (Bio-PDO®). O propanodiol Zemea® é um ingrediente produzido a partir de fontes 100% renováveis, o açúcar derivado do milho (PRESS RELEASE, 2007).

O propanodiol Susterra® é um glicol especial que oferece uma alternativa não-petrolífera para utilizações finais que desejam um produto de base biológica, sem afetar o desempenho ou qualidade. Susterra® pode ser usado em aplicações como fluidos de transferência de calor e como base para a refrigeração de motor, onde é importante considerar a estabilidade ao longo de um intervalo de temperaturas. Os benefícios incluem: produto obtido a partir de fontes 100% renováveis, baixa toxicidade e biodegradabilidade para aplicações de degelo; excelente ponto de congelamento para aplicações de solução aquosa que exigem proteção contra congelamento; melhor estabilidade térmica e menor corrosão do que outras formulações a base de propilenoglicol e etilenoglicol para aplicações como anti-congelante, resultando em maior durabilidade para os motores atuais de alto desempenho (DuPont Tate & Lyle BioProducts). Em aplicações poliméricas, o propanodiol Susterra® pode ser utilizado na fabricação de resinas de poliéster e como promotor das ligações cruzadas em cadeias uretânicas. Sorona® e Cerenol® são dois produtos da DuPont que utilizam as propriedades únicas do propanodiol Susterra®. Estes estão sendo usados em uma ampla variedade de segmentos como o automotivo, engenharia de polímeros, fibras e revestimentos (<http://www.duponttateandlyle.com>, acesso em 2012).

O Sorona®, também chamado PTT ou 3GT, é o poli (tereftalato de trimetileno), proveniente da condensação entre o 1,3-propanodiol (Bio-PDO®) e o ácido tereftálico (TPA) ou dimetil tereftalato (DMT). O polímero Sorona® foi criado pela DuPont e começou a ser comercializado em 2000 (DuPont). Sorona contém 37% em peso de fontes renováveis em sua composição, já o produto Cerenol® é uma linha inovadora de alto desempenho de polióis de fonte 100% renováveis (poliéterdióis). É uma substituição ideal para polióis derivados do petróleo e oferece uma infinidade de vantagens em muitos setores e mercados, sem comprometer a funcionalidade (DuPont). Cerenol® pode ser usado para formulações de cosméticos, fluidos funcionais, revestimentos, tintas e elastômeros de alto desempenho.

## CAPÍTULO 3

### 3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Neste capítulo estão descritos os procedimentos experimentais realizados para selecionar os micro-organismos e meios de fermentação como etapa preliminar do estudo da fermentação do glicerol. Com base nessa seleção realizou-se o estudo completo da fermentação para quantificar biomassa, 1,3-PDO produzido e glicerol consumido, além da determinação da cinética de crescimento para a linhagem que apresentou maior biomassa.

Ainda cumprindo o objetivo deste trabalho, com o auxílio do planejamento experimental Palckett-Burman, foi avaliada a influência dos constituintes do meio de cultivo na conversão do glicerol em 1,3-PDO, pela linhagem que apresentou melhor resultado na produção.

A síntese para produção do PTT também encontra-se descrita neste capítulo, bem como a montagem do reator de polimerização, a descrição das condições operacionais do processo de síntese e as técnicas para a caracterização do polímero.

#### 3.1 PRODUÇÃO DO 1,3-PROPANODIOL

##### 3.1.1 Reagentes

Os reagentes utilizados nos experimentos foram  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - Dinâmica,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - Dinâmica,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - Dinâmica, tioglicolato de sódio - Merck, Resazurina - Vetec,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - Dinâmica, HCl - Dinâmica,  $\text{ZnCl}_2$  - Dinâmica,  $\text{MnCl}_2$  - Dinâmica,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - Vetec,  $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - Dinâmica,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - Dinâmica,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - Synth,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  - Vetec,  $(\text{NH}_4)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - Dinâmica,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - Dinâmica,  $\text{CaCO}_3$  - Dinâmica, Glicerol - Quimex. Todos os reagentes foram utilizados sem qualquer tipo de preparação.

O glicerol bruto utilizado foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Cromatografia Industrial (DEQ-UFPE) sendo proveniente de uma planta piloto de produção de biodiesel a partir de óleo de soja e metanol via catálise básica.

### **3.1.2 Equipamentos**

Para o estudo da produção do 1,3-propanodiol os seguintes equipamentos foram utilizados:

- 1) Autoclave – Phoenix;
- 2) Banho térmico – Frigomix B;
- 3) Bomba a vácuo – Prismata;
- 4) Centrífuga 5403;
- 5) Chapa aquecedora – Novatécnica;
- 6) Conjunto para filtração em policarbonato 47 mm – Milipore;
- 7) Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) – LEB/FEA/UNICAMP;
- 8) Espectrofotometro UV-Vis – Meter;
- 9) Estufa – Leec;
- 10) Forno de esterilização;
- 11) Incubadora BOD BT 60 – Biothec.

### **3.1.3 Micro-organismos**

A seleção da linhagem partiu de um estudo preliminar para avaliar em qual meio de crescimento os micro-organismos apresentariam melhor adaptação, e como consequência teria um bom crescimento. Esse estudo foi necessário, pois estávamos trabalhando com micro-organismos que não pertenciam a coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Industrial (DEQ – UFPE).

No presente trabalho foram utilizadas as seguintes linhagens:

- 1- *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, Fundação André Tosello,
- 2- *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132, Fundação André Tosello,
- 3- *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259, gentilmente cedido pelo Departamento de Antibióticos - UFPE,
- 4- *Clostridium butyricum* DSMZ 10702, gentilmente cedido pelo Departamento de Engenharia Química e Tecnologia do Meio Ambiente – Universidade de Valladolid (Espanha).

### 3.1.3.1 Conservação

Os micro-organismos foram conservados a 4°C após 48 horas de crescimento em tubos de penicilina contendo meio tioglicolato de sódio para as cepas de *Clostridium acetobutylicum* e caldo Clostridial Reforçado para a cepa *Clostridium butyricum* e repicados mensalmente.

### 3.1.4 Meios de cultura

#### 3.1.4.1 Manutenção e crescimento

Para a manutenção e crescimento dos micro-organismos foram selecionados os seguintes meios:

- tioglicolato de sódio – marca BD;
- caldo Clostridial Reforçado (RCM) – marca Himedia.

Foram transferidos 80 mL dos meios para frascos de penicilina de 100 mL e em seguida purgado com nitrogênio para a remoção total do oxigênio, e assim se obter a condição de anaerobiose necessária (Figura 15). Posteriormente, os frascos de penicilina foram autoclavados por 15 minutos à temperatura de 120°C e pressão de 1atm (HIMMI *et al.*, 1999). Após a esterilização, os meios de cultivo foram inoculados com 10% v/v da cultura do micro-organismo e, em seguida os frascos foram colocados na incubadora a 35°C por 24 horas.



**Figura 15** – Preparação dos meios de crescimento e cultivo.

### 3.1.4.2 Inóculo

O inóculo foi preparado em frascos de penicilina de 100 mL contendo 80 mL de meio de crescimento, descrito no item 3.1.4. Após a esterilização, foram inoculados com 10% v/v da cultura do micro-organismo e em seguida os frascos foram colocados na incubadora a 35°C por 24 horas.

### 3.1.4.3 Meio de cultivo

O meio de cultivo utilizado para a produção do 1,3-PDO foi o mesmo utilizado por GUNZEL *et al.* (1991) e foi preparado de acordo com o descrito no item 3.1.4.1. Este meio foi modificado pela retirada do extrato de levedura e concentrações iniciais de glicerol de 10, 30 e 60 g.L<sup>-1</sup> (Tabela 5).

**Tabela 5** – Meios de cultivo utilizados nos experimentos com micro-organismos.

Componente	Meio 1	Meio 2	Meio 3
Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	10,0	30,0	60,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	1,0	1,0	1,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	0,5	0,5	0,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O (g.L <sup>-1</sup> )	5,0	5,0	5,0
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (g.L <sup>-1</sup> )	0,02	0,02	0,02
Solução elementos traços (mL.L <sup>-1</sup> )	1,0	1,0	1,0
Solução de ferro (mL.L <sup>-1</sup> )	1,0	1,0	1,0
Solução resazurina 0,0025% (mL.L <sup>-1</sup> )	4,0	4,0	4,0

### 3.1.5 Fermentação do glicerol

A fermentação em batelada utilizando o meio adotado por Gunzel *et al.* (1991), sem controle de pH, foi realizada em frascos de penicilina de 100 mL, com volume útil 80 mL do meio de cultivo adicionado de 0,09 mL de solução de tioglicolato de sódio, para assegurar a total ausência de oxigênio. Foram utilizados 10% v/v do inóculo crescido nas condições descritas no item 3.1.5. Em seguida foi incubado à temperatura de 35°C por 72 horas. As amostras foram retiradas em intervalos de 24 horas para determinar a biomassa, formação do 1,3-propanodiol e o consumo do glicerol.

### **3.1.6 Cinética de crescimento microbiano**

Os dados para a construção da cinética de crescimento foram obtidos através das amostras retiradas do meio fermentativo em intervalos de 2 horas, onde se determinou o aumento de biomassa e consumo de glicerol, durante 72 horas de fermentação.

### **3.1.7 Planejamento experimental Plackett-Burman (PB) para a produção de 1,3-propanodiol por *Clostridium butyricum* DSMZ 10702**

Para avaliar a influência dos constituintes do meio de cultivo na fermentação do glicerol para a produção do 1,3-propanodiol, foi utilizada a técnica do planejamento do tipo Plackett-Burman, no qual foram realizados 12 experimentos e 3 repetições no ponto central. Cada variável foi representada em dois níveis, denominada de alto nível (+1), baixo nível (-1) e ponto central (0). Neste estudo foram selecionadas oito variáveis ( $X_1$ : glicerol,  $X_2$ : extrato de levedura,  $X_3$ :  $K_2HPO_4$ ,  $X_4$ :  $KH_2PO_4$ ,  $X_5$ :  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $X_6$ :  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $X_7$ :  $C_7H_7NO_2$  – PABA (ácido para-aminobenzóico),  $X_8$ : pH inicial).

A Tabelas 6 apresenta as variáveis e os níveis, com as concentrações de cada uma, e a Tabela 7 apresenta a matriz do planejamento experimental. Na Tabela 6 cada linha representa um experimento e cada coluna representa uma variável independente ou inerte. As variáveis com níveis maiores de 95% de confiança foram consideradas significativas. Como resposta obteve-se a quantidade de 1,3-propanodiol produzido, o glicerol residual e biomassa formada em 72 horas de fermentação que foram analisados pelo software estatístico “Statistica 7.0” (Stasoft, Inc.).

Para se montar o planejamento foi feito um levantamento bibliográfico da literatura para se obter as concentrações máximas e mínimas dos nutrientes constituintes do meio de cultivo (Tabela 6), além de resultados citados nos trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia Industrial (DEQ-UFPE), FERREIRA *et al.* (2010a e 2010b) e LACERDA *et al.* (2012).

**Tabela 6** – Níveis das variáveis utilizadas no Planejamento Plackett-Burman para avaliação dos nutrientes e condições de cultivo na produção de 1,3-propanodiol, glicerol remanescente e biomassa da fermentação em batelada.

Parâmetros	Símbolo	Baixo nível (-1)	Ponto central (0)	Alto nível (+1)
Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	X <sub>1</sub>	10	20	30
Extrato de levedura (g.L <sup>-1</sup> )	X <sub>2</sub>	0	1,0	2,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	X <sub>3</sub>	0,03	0,08	1,6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	X <sub>4</sub>	0	0,25	0,5
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g.L <sup>-1</sup> )	X <sub>5</sub>	0	0,25	0,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	X <sub>6</sub>	0,5	1,0	1,5
PABA (g.L <sup>-1</sup> )	X <sub>7</sub>	0	0,004	0,008
pH inicial	X <sub>8</sub>	6,0	7,0	8,0

**Tabela 7** – Matriz do Planejamento experimental delineamento Plackett- Burman.

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
5 (central)	0	0	0	0	0	0	0	0
6	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
7	1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
8	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1
9	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1
10 (central)	0	0	0	0	0	0	0	0
11	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
12	1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
13	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
14	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
15 (central)	0	0	0	0	0	0	0	0

### 3.1.8 Tratamento dos dados experimentais

#### 3.1.8.1 Fatores de conversão

O fator de conversão ( $Y_{XS}$ ) (Equação 16) de substrato em células relaciona o crescimento celular, ou seja, aumento da biomassa, ao substrato consumido, indicando quanto o micro-organismo está utilizando do substrato para seu crescimento.

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_o}{S_o - S} \quad (16)$$

Onde:

- $X$  é a concentração final de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ );
- $X_o$  é a concentração inicial de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ );
- $S$  é a concentração final de glicerol ( $\text{g.L}^{-1}$ );
- $S_o$  é a concentração inicial de glicerol ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

O fator de conversão ( $Y_{P/S}$ ) (Equação 17) de substrato em produto relaciona a produção do 1,3-PDO ao substrato consumido para essa finalidade, indicando quanto o micro-organismo está utilizando o substrato para a produção do produto.

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_o}{S_o - S} \quad (17)$$

Onde:

- $P$  é a concentração final de 1,3-propanodiol ( $\text{g.L}^{-1}$ );
- $P_o$  é a concentração inicial de 1,3-propanodiol ( $\text{g.L}^{-1}$ );
- $S$  é a concentração final de glicerol ( $\text{g.L}^{-1}$ );
- $S_o$  é a concentração inicial de glicerol ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

### 3.1.9 Métodos analíticos

#### 3.1.9.1 Análise do glicerol bruto

Para análise do glicerol bruto foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) realizada no Laboratório de Cromatografia Industrial do Departamento de Engenharia Química da UFPE. A metodologia adotada foi desenvolvida pelo próprio laboratório utilizando 30 mg de amostra adicionadas em 2,5 mL de água destilada e filtradas com filtro de náilon 0,25  $\mu\text{m}$ . O equipamento utilizado é da marca Gilson modelo 305; detector de índice de refração modelo CG 410-B e as condições de trabalho foram: fase móvel acetonitrila / água deionizada 75:25 (v/v) com fluxo de 1 mL/min., fase estacionária: Prevail Carbohydrate ES (250 mm de

comprimento, 4,2 mm de diâmetro e 5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula), em temperatura ambiente. Foi empregada uma válvula de injeção manual marca Rheodyne, com um volume de amostra de 20 mL e o tempo de análise de 8 minutos.

### *3.1.9.2 Curva de calibração de biomassa*

As curvas de calibração de biomassa das linhagens *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132 e *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 foram construídas para avaliar a massa celular do micro-organismo durante o seu crescimento. A curva de calibração foi obtida preparando-se uma suspensão celular em solução salina (água destilada com 0,9 % m/V de NaCl em água destilada. Desta suspensão, retirou-se amostra (5 mL), que foi filtrada em membranas de acetato de celulose (0,22  $\mu\text{m}$ ) e seca em estufa a 90°C até peso constante e, em seguida, pesada. Da mesma suspensão foram feitas diferentes diluições de modo a se obter concentrações celulares distintas e, então, mediu-se a absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 640 nm, obtendo-se a curva de peso seco. Assim relacionou-se a concentração da massa celular com a densidade ótica e obteve-se a curva padrão de biomassa.

### *3.1.9.3 Determinação da biomassa*

Amostras de 10 mL do mosto fermentado foram retiradas e filtradas em membranas de acetato de celulose (0,22  $\mu\text{m}$ ). A biomassa foi determinada através de medidas de densidade óptica a 640 nm e esses valores foram convertidos para  $\text{g.L}^{-1}$  utilizando-se o fator de conversão obtido pelas curvas de calibração de biomassa.

### *3.1.9.4 Identificação e quantificação do 1,3-PDO e glicerol por CLAE*

Para identificação e quantificação do 1,3-PDO formado e glicerol residual obtidos pela fermentação foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As análises foram realizadas no Laboratório de Bioprocessos (LEB – UNICAMP) nas seguintes condições de trabalho: coluna HPX-87H, fase móvel ácido sulfúrico 0,5mM, temperatura da coluna 50°C, fluxo de 6 mL/min, tempo de corrida de 20 minutos (BIEBL *et al.*, 1992; CHATZIFRAGKOU *et al.*, 2011; GONZÁLEZ-

PAJUELO *et al.*, 2005a; GONZÁLEZ-PAJUELO *et al.*, 2005b, GUNGORMUSLER *et al.*, 2010; GUNZEL *et al.*, 1991). As concentrações foram determinadas com o auxílio da curva de calibração construída a partir da solução padrão de 1,3-propanodiol (Fluka) e glicerol (Merck) na faixa de concentração de 0,2 - 1,0 mg/L. A aquisição e análise dos dados foram realizados utilizando o software Millenium (Varian).

### 3.2 PRODUÇÃO DO POLI(TEREFTALATO DE TRIMETILENO) - PTT

#### 3.2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados nas reações foram o 1,3-propanodiol P.A., marca Fluka, o ácido tereftálico e trióxido de antimônio fornecidos pela Terphane.

#### 3.2.2 Reator de polimerização

A reação de polimerização foi realizada em um sistema reacional desenvolvido pelo Laboratório de Materiais Poliméricos e Caracterização (LMPC/DEQ) constituído de reator de vidro de 2L conectado ao sistema de vácuo, um condensador e um coletor. O reator foi aquecido por uma manta elétrica conectada a um controlador de temperatura. A Figura 16 apresenta o sistema reacional utilizado na síntese do poli(tereftalato de trimetileno) - (PTT).



**Figura 16** – Unidade experimental utilizada na síntese do poli(tereftalato de trimetileno) – PTT (1- Coletor, 2 - Condensador, 3 - Entrada de nitrogênio, 4 - Agitador, 5 - Termopar, 6 - Reator, 7 - Manta aquecimento, 8 - Trapp, 9 - Controlador de temperatura e pressão, 10 - Bomba de vácuo).

O reator apresenta na sua parte superior um ponto para alimentação de nitrogênio, um poço para instalação de um termopar, que permite o acompanhamento do perfil de temperatura da reação. O sistema também é dotado de uma abertura para introduzir a haste de agitação do tipo âncora, que é movida por um motor de rotação variável.

O condensador está conectado ao reator e ao coletor de condensado, estando posicionado de forma inclinada entre esses dois equipamentos para tornar possível a exaustão do condensado líquido por gravidade. O condensador é circundado por uma camisa de resfriamento, por onde circula água à temperatura ambiente.

O coletor de condensado possui volume aproximado de 200 mL e permite quantificar o subproduto ( $H_2O$ ) da reação e assim controlar a reação. Também foram instalados um *trapp* (para remoção de condensados voláteis) e uma bomba de vácuo da marca Dos Vac. O *trapp* é resfriado com água para evitar a passagem de condensado para a bomba.

### 3.2.3 Policondensação do poli(tereftalato de trimetileno) – PTT

As polimerizações foram realizadas no sistema reacional descrito anteriormente (Figura 16) em regime de batelada simples. As condições reacionais foram mantidas constantes para todas as reações, a fim de garantir a reproduzibilidade da metodologia adotada nesse trabalho.

A Tabela 8 apresenta resumidamente as condições operacionais aplicadas durante a polimerização do PTT realizada em regime de batelada.

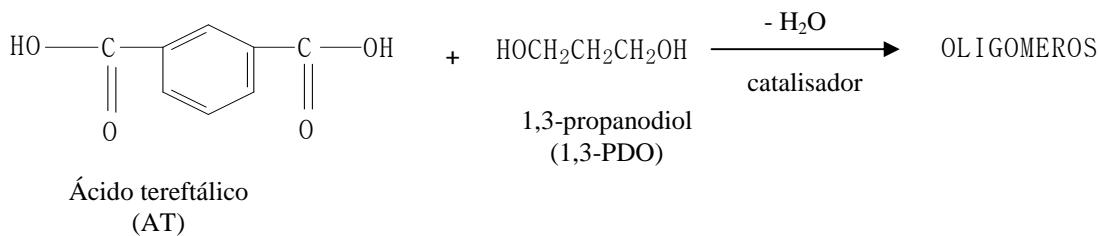
**Tabela 8** – Condições operacionais aplicadas nas reações de polimerização do PTT.

	<b>Etapa 1</b>	<b>Etapa 2</b>
Temperatura (°C)	245	265
Pressão (mmHg)	120	120
Agitação (rpm)	90	90
Tempo (minutos)	165	240

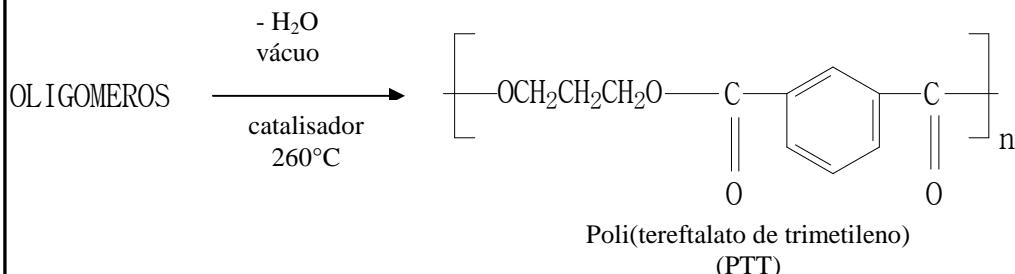
O processo de síntese do PTT foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa foi adicionado ao reator o ácido tereftálico (AT) e o 1,3-propanodiol (1,3-PDO) na razão molar de AT/1,3-PDO = 1/2,2 e acrescentou-se 120 mg do catalisador trióxido de antimônio ( $Sb_2O_3$ ) no início da reação. Para uma perfeita homogeneização, foi necessário agitação mecânica constante. O fluxo de nitrogênio no sistema foi mantido constante durante 60 minutos no início da reação, para garantir que a reação ocorresse sob atmosfera inerte, com o objetivo de evitar degradação e oxidação do polímero.

Na segunda etapa da polimerização, a temperatura foi elevada de 245 para 265°C, e a pressão mantida constante, com o objetivo para conter a evaporação dos reagentes e dos oligômeros de menor massa molar, além de remover a água, subproduto da reação, deslocando o equilíbrio no sentido do crescimento da cadeia polimérica. Nesta etapa, e também ocorre a retirada do 1,3-PDO presente em excesso na reação. Admitiu-se que a reação de policondensação estava finalizada quando não se observavam mais a remoção de quantidade significativa de condensado. As reações envolvidas durante a síntese do PTT estão apresentadas na Figura 17.

Etapa 1: Esterificação



Etapa 2: Policondensação



**Figura 17** – Reações que representam o processo de obtenção do PTT (KARAYANNIDIS *et al.*, 2003).

### 3.2.4 Técnicas de Caracterização do PTT

O polímero obtido a partir de polimerizações em batelada realizadas foi caracterizado por algumas análises, com o objetivo de verificar a formação do poli(tereftalato de trimetileno).

#### 3.2.4.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

O polímero produzido foi analisado por FTIR com o objetivo de verificar a composição química das cadeias poliméricas do poliéster. Nas análises, foi utilizado um espectrômetro Spectrum 400, Marca Perkin Elmer com Transformada de Fourier com uso do acessório de reflectância total atenuada (UATR). As análises foram realizadas em condições ambientais, com a amostra em forma de pó, em modo de transmitância na faixa de número de onda de 500 - 4000 cm<sup>-1</sup>.

### 3.2.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As análises de DSC foram realizadas com o objetivo de determinar as características térmicas do poli(tereftalato de trimetileno). A técnica de DSC mede, através de uma programação controlada de temperatura (aquecimento ou resfriamento), a energia envolvida na transformação do material analisado, tendo como referência um material termicamente inerte. As análises de DSC foram realizadas no equipamento modelo *Differential Scanning Calorimeter Pyris 6* da marca Perkin Elmer<sup>®</sup>, pertencente ao Laboratório de Polímeros e Nanocompósitos (PNC) do Departamento de Física da UFPE. Para a realização das análises, as amostras foram pulverizadas e 10 mg foram analisados em cadinhos de alumínio fechados. Como referência, utilizou-se um cadinho de alumínio vazio. Os termogramas foram obtidos do segundo ciclo de aquecimento e resfriamento na faixa de temperatura de 0-300°C, usando-se taxa de aquecimento constante de 10°C/min sob atmosfera de nitrogênio.

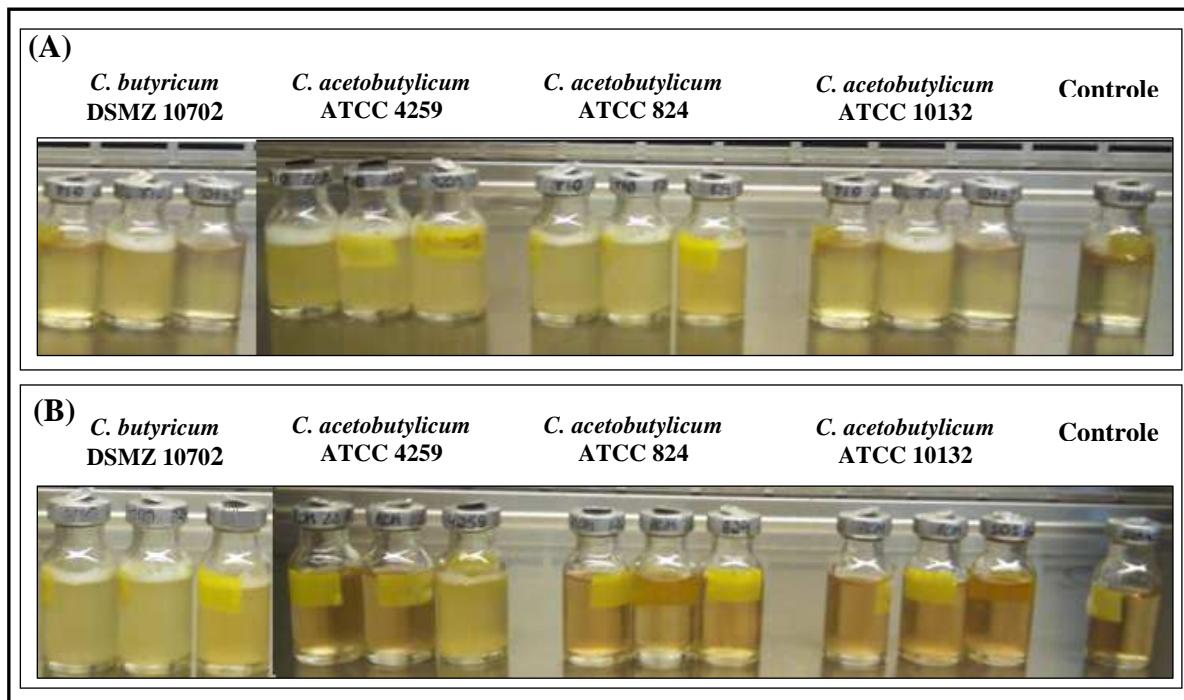
## CAPÍTULO 4

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1 SELEÇÃO DAS LINHAGENS DE *Clostridium*

Os micro-organismos *Clostridium butyricum* DSMZ 10702, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259, ATCC 824, ATCC 10132 e foram inoculados nos dois meios de crescimento, tioglicolato de sódio e RCM, de acordo com o item 3.1.4.1, para verificar em qual apresentou melhores resultados para o aumento de biomassa. O meio de tioglicolato de sódio foi o qual as linhagens *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, ATCC 4259, ATCC 10132 se adaptaram melhor e apenas o *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 cresceu melhor no meio RCM.

O crescimento dos micro-organismos pode ser observado a partir da turvação do meio após 24 horas de fermentação do glicerol P.A. como apresenta a Figura 18.



**Figura 18** – Crescimento das linhagens de *Clostridium* (A) em meio tioglicolato de sódio e (B) em RCM.

A partir dos resultados avaliados pela turvação do meio de cultivo (Figura 18) foi definido o meio de crescimento adequado que no caso foi o tioglicolato de sódio

para as linhagens de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, ATCC 4259, ATCC 10132 e o meio RCM para o *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 para os ensaios posteriores.

#### 4.2 CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA AVALIAR O CRESCIMENTO CELULAR DOS MICRO-ORGANISMOS

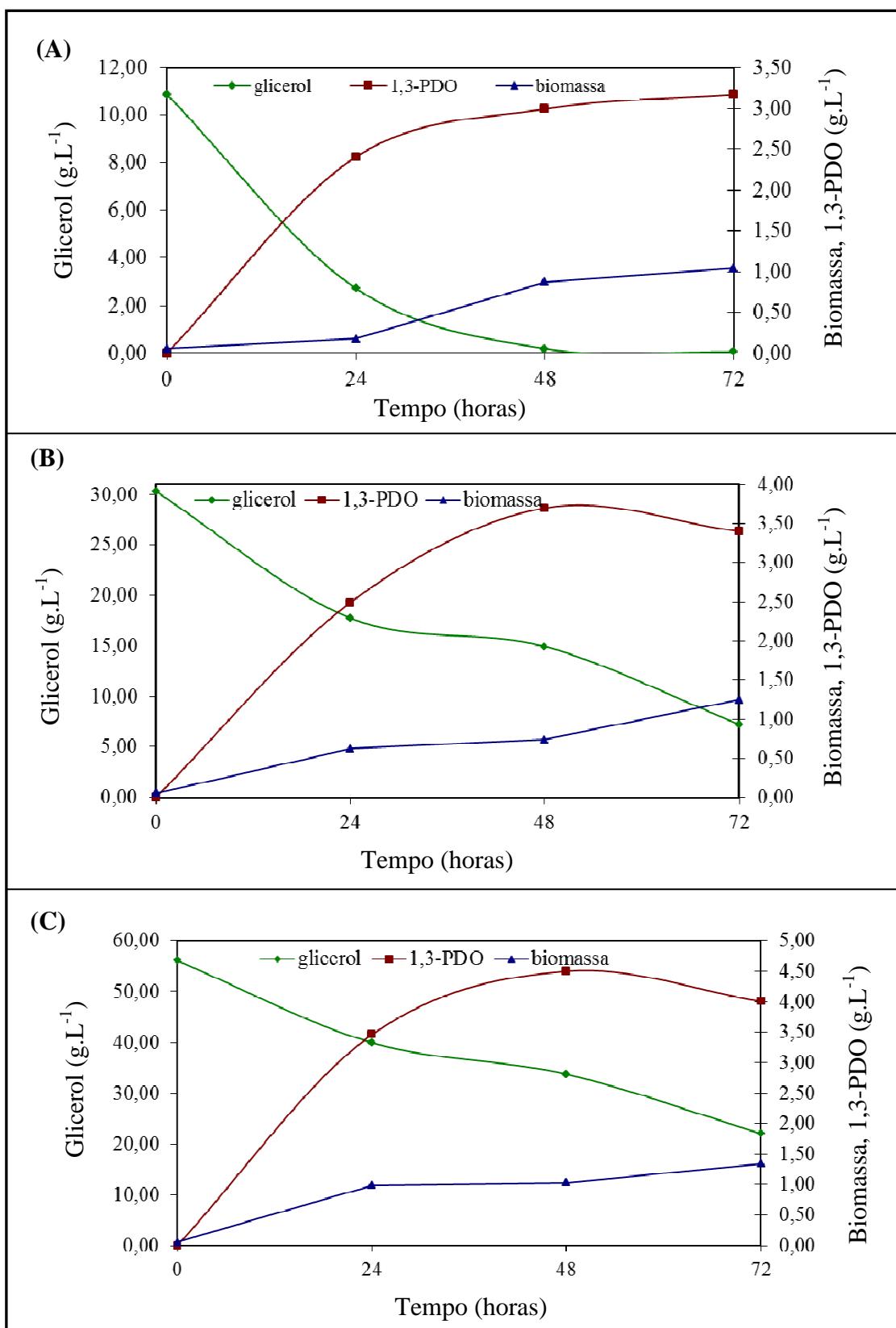
Foram construídas as curvas de calibração para os micro-organismos *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132 e *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 conforme a metodologia descrita no item 3.1.4.1 e estão apresentadas na Figura 33 contida no Apêndice. A equação de cada reta obtida mostra a relação direta entre a leitura ótica (absorbância) e a concentração de biomassa.

As amostras foram retiradas a cada 2 horas durante 24 horas de fermentação e filtradas em membranas de acetato de celulose (0,22 µm). Em seguida foi feita a leitura da absorbância utilizando o espectrofotômetro e assim correlacionada com a concentração celular. A partir das curvas de calibração de cada micro-organismo foi possível acompanhar o perfil do crescimento de cada um deles nos ensaios de fermentação em que foram utilizados para a produção do 1,3-propanodiol, utilizando o glicerol P.A. como principal fonte de carbono, e assim poder definir as fases de crescimento dos micro-organismos e sua relação direta com a produção do 1,3-PDO.

#### 4.3 FERMENTAÇÃO DO GLICEROL P.A.

##### 4.3.1 *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259

A Figura 19 apresenta o crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO nas fermentações em batelada com *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 realizadas nos Meios de cultivo 1, 2 e 3 com concentração inicial de 10,0, 30,0 e 60,0 g.L<sup>-1</sup> glicerol, respectivamente, como descrito no item 3.1.4.2.



**Figura 19** – Crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO pelo *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 no (A) Meio 1, (B) Meio 2 e (C) Meio 3.

Analizando a Figura 19 pode-se observar que o perfil da curvas de produção do 1,3-PDO é similar ao perfil da curva de crescimento da biomassa até 48 horas de fermentação, indicando que a produção de 1,3-PDO é diretamente relacionada ao crescimento do micro-organismo (SAXENA *et al.*, 2009).

Através da Figura 19A os parâmetros como, crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-propanodiol, foram avaliados para a fermentação do glicerol P.A. pelo micro-organismo *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 no meio de cultivo contendo 10,0 g.L<sup>-1</sup> de substrato. Foi possível verificar que o micro-organismo estudado consumiu em torno de 99% do glicerol P.A. presente no meio durante 72 horas de fermentação. Ainda analisando a Figura 19A a concentração celular obtida foi de 1,04 g.L<sup>-1</sup> e foi produzido 3,17 g.L<sup>-1</sup> de 1,3-propanodiol.

A Figura 19B apresenta os resultados da fermentação de 30,0 g.L<sup>-1</sup> do glicerol P.A. pelo micro-organismo *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259. O consumo de glicerol foi de 76%, biomassa aumentou para 1,24 g.L<sup>-1</sup> e ocorreu a produção de 3,4 g.L<sup>-1</sup> de 1,3-PDO.

Analizando a fermentação contendo 60,0 g.L<sup>-1</sup> de glicerol P.A. inicial o micro-organismo *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 foi capaz de consumir 60% do substrato. A Figura 19C apresenta o crescimento celular de 1,34 g.L<sup>-1</sup> e 4,0 g.L<sup>-1</sup> de 1,3-PDO produzido.

Na literatura são poucos os trabalhos utilizando *Clostridium acetobutylicum* para a produção de 1,3-PDO. Esse micro-organismo é comumente estudado para a produção de acetona, butanol e etanol e na última década ele tem sido adaptado para a produção de 1,3-PDO quando modificados geneticamente (GONZÁLEZ-PAJUELO *et al.*, 2005a; 2005b; 2006). Essa modificação ocorre quando se adiciona genes do *Clostridium butyricum*, que é um produtor natural de 1,3-PDO, à linhagem do *Clostridium acetobutylicum* (DROZDZYNSKA *et al.*, 2011, SAXENA *et al.*, 2009). González-Pajuelo *et al.* (2005a) em seu trabalho utilizaram 10,0 g.L<sup>-1</sup> de glicerol P.A. inicial numa fermentação contínua com o micro-organismo *Clostridium acetobutylicum* DG1(pSPD5). A concentração de 1,3-PDO obtida foi 5,49 g.L<sup>-1</sup> e 0,62 mol.mol<sup>-1</sup> de rendimento de conversão de glicerol em 1,3-PDO em 36 horas de fermentação contínua.

Na fermentação utilizando o *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 a maior produção de 1,3-PDO foi 3,17 g.L<sup>-1</sup> e rendimento de 24% em 72 horas de fermentação. Estes resultados foram obtidos quando se utilizou a menor concentração de glicerol P.A. que foi 10 g.L<sup>-1</sup>, o que concorda com os resultados obtidos por González-Pajuelo *et al.*

(2005a) que alcançaram os melhores resultados quando trabalhou com 10 g.L<sup>-1</sup> de glicerol em 36 horas de fermentação.

A Tabela 9 apresenta os fatores de conversão de glicerol em biomassa e de glicerol em 1,3-PDO obtidos para as fermentações, durante 72h de cultivo, com *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 nos meios de cultivo 1, 2 e 3. A fermentação que apresentou melhor rendimento na conversão do glicerol em 1,3-PDO foi a que utilizou a menor concentração inicial de glicerol, 10 g.L<sup>-1</sup> (meio 1) resultando em 24% de conversão. As outras fermentações com os meios de cultivo contendo 30 g.L<sup>-1</sup> (meio 2) e 60 g.L<sup>-1</sup> (meio 3) de glicerol apresentaram resultados em torno de 5%.

Esses resultados indicam que *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 nas condições do processo adotadas tenha sofrido inibição pelo substrato, ou seja, na quantidade acima de 10 g.L<sup>-1</sup> o micro-organismo tem dificuldade em metabolizar o substrato gerando uma quantidade maior de glicerol remanecente, comprometendo a produção do 1,3-PDO.

**Tabela 9** – Rendimentos da fermentação do glicerol P.A. pelo *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 nos meios de cultivo 1, 2 e 3.

Fermentação (horas)	Meio de cultivo					
	1	2	3	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}^b$	$Y_{X/S}^a$
0	0	0	0	0	0	0
24	0,211	0,107	0,149	0,047	0,118	0,038
48	0,294	0,110	0,203	0,050	0,201	0,044
72	0,305	0,240	0,246	0,055	0,214	0,058

<sup>a</sup> Rendimento de biomassa (*X*) por glicerol (*S*) consumido em mol.mol<sup>-1</sup>

<sup>b</sup> Rendimento de 1,3-propanodiol (*P*) por glicerol (*S*) consumido em mol.mol<sup>-1</sup>

Papanikolaou *et al.* (2000) estudaram a produção do 1,3-PDO por uma linhagem isolada de *Clostridium butyricum*, e alcançaram a melhor produção de 1,3-PDO, a partir do glicerol P.A.em um processo contínuo. Os resultados ficaram entre 31 – 48 g.L<sup>-1</sup> em 26 horas de fermentação. Em outro estudo, alterando o processo de fermentação para batelada alimentada, o máximo de 1,3-PDO produzido variou entre 41 – 46 g.L<sup>-1</sup> em 42 horas de processo.

González-Pajuelo *et al.* (2005b) comparando uma espécie natural de *Clostridium butyricum* VPI 3266 com outra modificada geneticamente, *Clostridium acetobutylicum* DG1(pSPD5), contendo genes para a produção do 1,3-PDO, observaram que em 47 horas de fermentação em batelada alimentada, a cepa modificada alcançou rendimento

de 0,62 mol.mol<sup>-1</sup> de 1,3-PDO por glicerol e a cepa natural 0,69 mol.mol<sup>-1</sup> de 1,3-PDO por glicerol.

Neste trabalho o melhor rendimento alcançado para a produção do 1,3-PDO foi 24% de conversão e praticamente não restando glicerol presente no meio de cultivo. Quando comparado este resultado com o de González-Pajuelo *et al.* (2005b) verifica-se o rendimento foi inferior, provavelmente as condições adotadas na fermentação, fermentação contínua, controle de pH, tenham influenciado para o melhor rendimento.

#### 4.3.1.1 Cinética de crescimento do *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259

As culturas em batelada do *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 foram realizadas utilizando como fonte de carbono o glicerol P.A. O crescimento microbiano e a produção de 1,3-PDO foram acompanhados nas fermentações onde se usou tres concentrações diferentes de glicerol, 10, 30 e 60 g.L<sup>-1</sup>, com o objetivo de avaliar qual apresentaria melhor rendimento, com apresentado na Figura 19.

O consumo de glicerol foi em torno de 99% (Figura 19A), indicando que o micro-organismo foi capaz de consumir o substrato, enquanto que a produção de 1,3-PDO correspondente 3,17 g.L<sup>-1</sup> a  $S_0 = 10 \text{ g.L}^{-1}$ . O rendimento de conversão foi de 0,240 mol.mol<sup>-1</sup> e rendimento de conversão de biomassa foi de 0,305 mol.mol<sup>-1</sup>, em 72 horas (Tabela 9).

Para determinar os parâmetros cinéticos para a construção do modelo apresentados na Tabela 10 foram selecionados a partir dos dados da fermentação utilizando 10 g.L<sup>-1</sup> de glicerol, pois apresentou o melhor resultado para a produção de 1,3-PDO e biomassa, tal como mostrado na Figura 19A e na Tabela 9.

Os parâmetros do modelo,  $K_S$  e  $\mu_m$  foram estimados e aplicados nos dados experimentais utilizando as Equações 10 a 15. Todos os resultados estão apresentados na Tabela 10, com coeficiente de correlação para o glicerol e biomassa igual a 0,998.

**Tabela 10** – Parâmetros cinéticos da fermentação em batelada do glicerol pelo *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259.

Parâmetros	Valores
$S_0$ (g.L <sup>-1</sup> )	10,00
$X_0$ (g.L <sup>-1</sup> )	0,0516
$Y_{X/S}$ (mol.mol <sup>-1</sup> )	0,305
$\mu_{\text{máx}}$ (h <sup>-1</sup> )	0,024
$K_S$ (g.L <sup>-1</sup> )	0,011
r <sup>2</sup>	0,998

$S_0$ : Concentração inicial de glicerol.

$X_0$ : Concentração inicial de biomassa.

$Y_{X/S}$ : Conversão de glicerol em biomassa

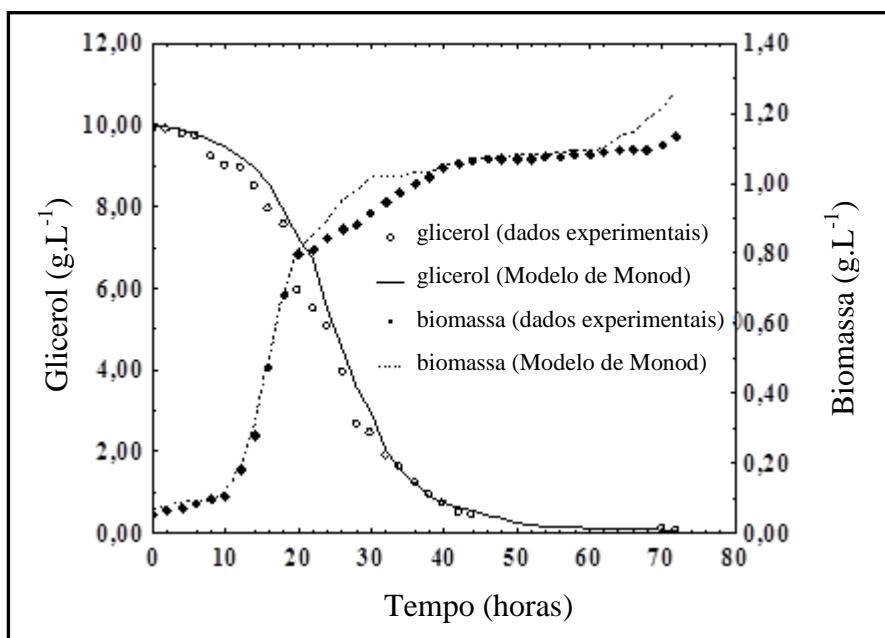
$\mu_{\text{máx}}$ : Velocidade máxima do crescimento celular.

$K$ : Constante de saturação de Monod.

r<sup>2</sup>: Coeficiente de correlação.

A Figura 20 apresenta os valores de biomassa e glicerol calculados a partir das Equações obtidas pelo modelo de Monod e os dados experimentais, indicando que o modelo se adapta às condições utilizadas na fermentação do glicerol pelo *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259. Como mostra a Figura 19, o crescimento microbiano foi suficiente, e acompanhado pelo consumo do substrato.

A cinética de crescimento do *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 em glicerol (Figura 19) revelou que a fase lag foi em torno de 10 horas, e não foi acompanhada pelo consumo do substrato. Em seguida, o crescimento celular com produção simultânea de metabólitos ocorreu. A velocidade específica máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) do *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259, a partir dos dados experimentais, foi de 0,024 h<sup>-1</sup>.



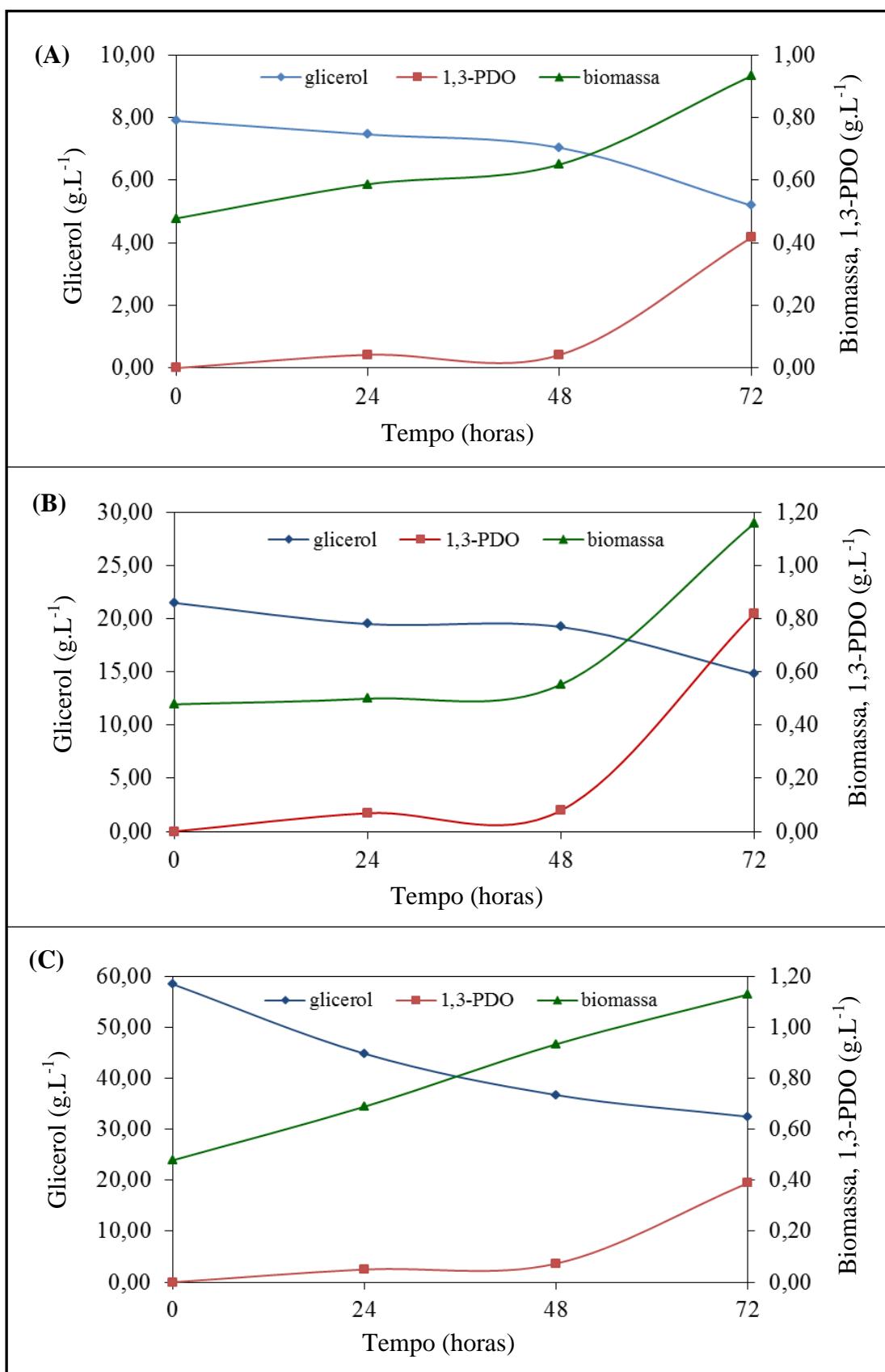
**Figura 20** – Comparaçāo entre os valores de biomassa e glicerol calculados pelo modelo de Monod (linhas sólidas) e dados experimentais (símbolos) para a fermentaçāo do glicerol pelo micro-organismo *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259.

Papanikolau e Aggelis (2003) propuseram o modelo de Contois na fermentaçāo em batelada do glicerol bruto ( $90 \text{ g.L}^{-1}$ ) pelo *Clostridium butyricum* F2b nas seguintes condições de cultivo, crescimento em “flasks”, pH inicial de 7 e temperatura de incubação de  $33^{\circ}\text{C}$ . Os valores encontrados de  $\mu_m$  a partir do modelo de Contois foi  $0,527 \text{ h}^{-1}$ .

Neste trabalho a utilização do modelo de Monod apresentou bastante adequado as condições de fermentaçāo adotadas, sendo que os dados experimentais se ajustaram bem ao modelo proposto (Figura 20). Essa resposta reforça a interpretaçāo de que a concentraçāo de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol utilizado na fermentaçāo não apresentou inibição em relaçāo ao crescimento do micro-organismo.

#### 4.3.2 *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824

Os dados da fermentaçāo do glicerol P.A. pelo *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 para a produçāo do 1,3-propanodiol nos Meios 1, 2 e 3 estāo apresentados na Figura 21.



**Figura 21** – Crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO pelo *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 no (A) Meio 1, (B) Meio 2 e (C) Meio 3.

A Figura 21A apresenta o crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-propanodiol em função do tempo para o micro-organismo *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 no meio de cultivo 1. Nessa fermentação o micro-organismo foi capaz de consumir 34% do glicerol P.A. presente no meio após 72 horas de fermentação, obtendo a concentração celular de  $0,93 \text{ g.L}^{-1}$  e  $0,42 \text{ g.L}^{-1}$  de 1,3-propanodiol.

A fermentação realizada no meio de cultivo 2 com o *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 apresentou um consumo menor de glicerol P.A. e crescimento maior de biomassa, quando comparado com os resultados do meio 1. A Figura 21B mostra que o glicerol foi consumido 31,14%, a biomassa para 1,15% e  $0,89 \text{ g.L}^{-1}$  de 1,3-PDO foi produzido.

No cultivo utilizando o meio 3 (Figura 21C) houve um consumo de 44,5% do glicerol pelo micro-organismo *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, obtendo crescimento celular de  $1,12 \text{ g.L}^{-1}$  e  $0,39 \text{ g.L}^{-1}$  de 1,3-PDO produzido.

A Tabela 11 apresenta os fatores de conversão de glicerol em biomassa e glicerol em 1,3-PDO para o *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 em meios de cultivo com diferentes concentrações de glicerol, 10, 30 e  $60 \text{ g.L}^{-1}$ .

**Tabela 11** – Rendimentos da fermentação do glicerol P.A. pelo *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 nos meios de cultivo 1, 2 e 3.

Fermentação (horas)	Meio de cultivo					
	1		2		3	
	$Y_{X/S}^a$	$Y_{P/S}^b$	$Y_{X/S}^a$	$Y_{P/S}^b$	$Y_{X/S}^a$	$Y_{P/S}^b$
0	0	0	0	0	0	0
24	0,075	0,098	0,128	0,027	0,092	0,028
48	0,139	0,124	0,164	0,052	0,113	0,033
72	0,210	0,153	0,192	0,089	0,125	0,067

<sup>a</sup> Rendimento de biomassa ( $X$ ) por glicerol ( $S$ ) consumido em mol.mol<sup>-1</sup>

<sup>b</sup> Rendimento de 1,3-propanodiol ( $P$ ) por glicerol ( $S$ ) consumido em mol.mol<sup>-1</sup>

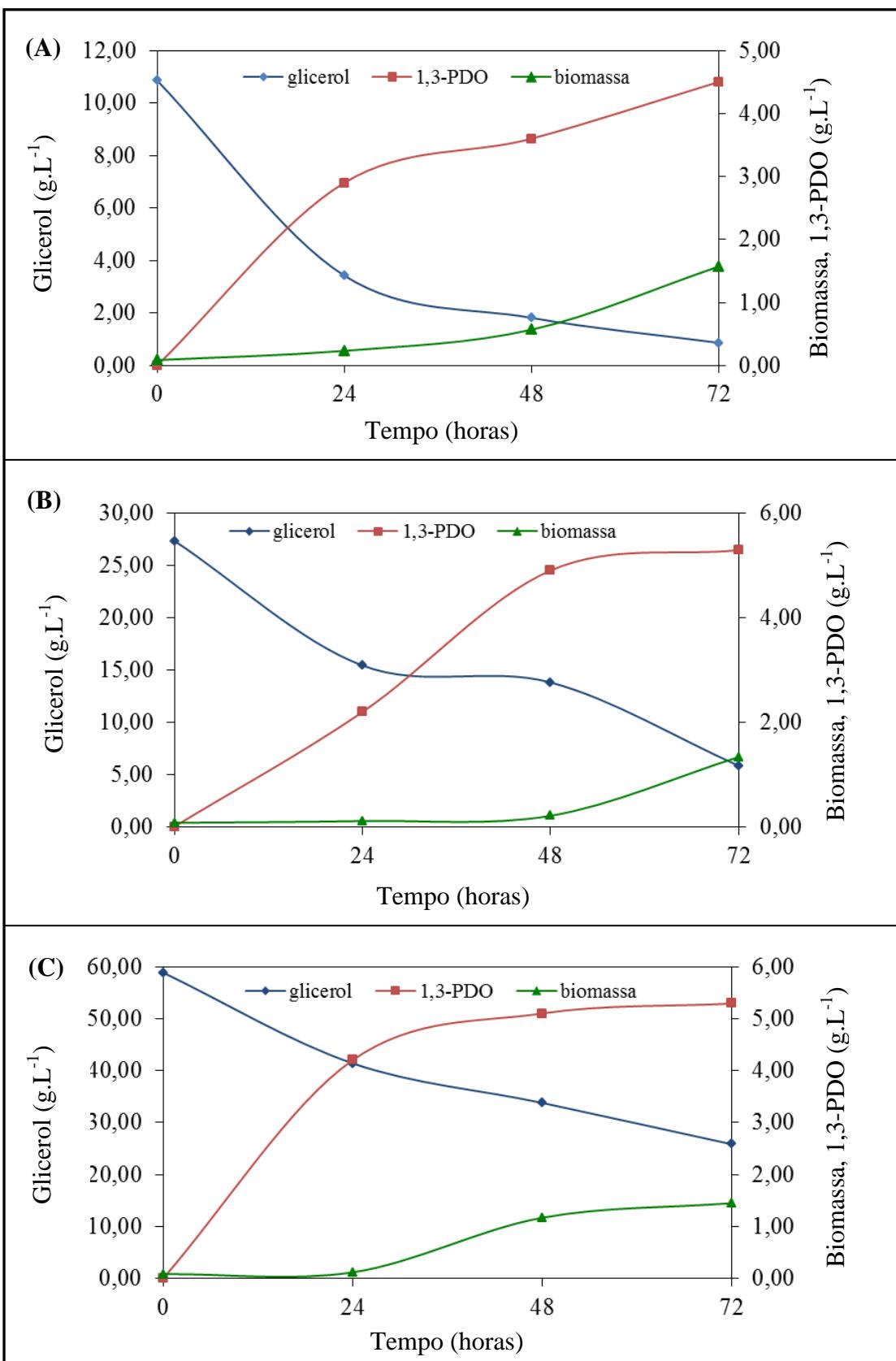
Analizando a Figura 21 e a Tabela 11 observa-se que a maior produção de 1,3-PDO ocorreu no meio de cultivo contendo a concentração inicial  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol P.A. em 72 horas de fermentação com conversão de glicerol em 1,3-PDO de 15,3%. Neste mesmo meio de cultivo obteve-se a maior produção de biomassa por consumo de glicerol, 21%. Estes resultados apresentam concordância com os obtidos pelo *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259, pois as duas linhagens conseguiram consumir

em maior quantidade o glicerol quando este está presente em menor concentração no meio de cultivo.

#### **4.3.3 *Clostridium butyricum* DSMZ 10702**

A Figura 22 mostra os perfis cinéticos de biomassa, produção e consumo de glicerol para o micro-organismo *Clostridium butyricum* DSMZ 10702.

A fermentação do glicerol P.A. pelo *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 apresentou características semelhantes as fermentações utilizando os *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 e *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, pois em todos os processos o melhor resultado para a bioconversão do glicerol em 1,3-PDO foi quando se utilizou a menor concentração inicial de glicerol, 10 g.L<sup>-1</sup>.



**Figura 22** – Crescimento celular, consumo de glicerol e produção de 1,3-PDO pelo micro-organismo *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 no (A) Meio 1, (B) Meio 2 e (C) Meio 3.

Na fermentação contendo a concentração inicial de glicerol de 10 g.L<sup>-1</sup> (Figura 22A) os resultados apresentaram que o *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 foi capaz de consumir quase todo o glicerol, restando em torno de 1,0 g.L<sup>-1</sup>. A produção de 1,3-PDO e biomassa foi 4,5 g.L<sup>-1</sup> e 1,6 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Na Figura 22B estão apresentados os resultados da fermentação contendo a concentração inicial de 30 g.L<sup>-1</sup> de glicerol. O micro-organismo produziu 5,3 g.L<sup>-1</sup> de 1,3-PDO e 1,3 g.L<sup>-1</sup> de biomassa, permanecendo ainda no meio de cultivo 5,8 g.L<sup>-1</sup> de glicerol. Já na fermentação contendo 60 g.L<sup>-1</sup> de glicerol P.A. com o micro-organismo *Clostridium butyricum* DSMZ 10702, apresentada na Figura 22C, este foi capaz de produzir 5,3 g.L<sup>-1</sup> de 1,3-PDO, 1,5 g.L<sup>-1</sup> de biomassa, e o micro-organismo consumiu 55% do glicerol.

Diante dos resultados foi possível avaliar que a produção de 1,3-PDO pelo *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 ficou entre 4,5 – 5,3 g.L<sup>-1</sup> e biomassa em torno de 1,5 g.L<sup>-1</sup>. Apesar da produção de 1,3-PDO ter sido praticamente a mesma para as três concentrações de glicerol utilizadas (10, 30 e 60 g.L<sup>-1</sup>), o fator mais importante a ser analisado é a capacidade de conversão do glicerol em 1,3-PDO pelo micro-organismo. Das fermentações realizadas, a que utilizou a concentração de 10 g.L<sup>-1</sup> de glicerol foi a que apresentou melhor rendimento, 54,4% (Tabela 12) ou seja, nas condições utilizadas quando se aumentou a concentração de glicerol de 10 g.L<sup>-1</sup>, o micro-organismo *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 teve o crescimento celular limitado e como consequência a produção de 1,3-PDO ficou comprometida.

**Tabela 12** – Rendimentos da fermentação do glicerol P.A. pelo *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 nos meios de cultivo 1, 2 e 3.

Fermentação (horas)	Meio de cultivo					
	1		2		3	
	$Y_{X/S}$ <sup>a</sup>	$Y_{P/S}$ <sup>b</sup>	$Y_{X/S}$ <sup>a</sup>	$Y_{P/S}$ <sup>b</sup>	$Y_{X/S}$ <sup>a</sup>	$Y_{P/S}$ <sup>b</sup>
0	0	0	0	0	0	0
24	0,039	0,546	0,029	0,224	0,043	0,192
48	0,057	0,481	0,049	0,144	0,064	0,246
72	0,443	0,544	0,610	0,299	0,400	0,294

<sup>a</sup> Rendimento de biomassa ( $X$ ) por glicerol ( $S$ ) consumido em mol.mol<sup>-1</sup>

<sup>b</sup> Rendimento de 1,3-propanodiol ( $P$ ) por glicerol ( $S$ ) consumido em mol.mol<sup>-1</sup>

Pinto (2009) em seu trabalho utilizou *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 na fermentação com 30 g.L<sup>-1</sup> de glicerol P.A. aproximadamente em 80 horas de processo

em biorreator, com controle de pH em 6,5 e temperatura de 33°C. A conversão molar de glicerol em 1,3-PDO obtida foi 0,56 mol.mol<sup>-1</sup> e produção de 1,3-PDO foi 13,95 g.L<sup>-1</sup>.

Neste trabalho, utilizando o mesmo micro-organismo que Pinto (2009) obteve-se o melhor rendimento para a conversão de glicerol em 1,3- PDO foi 0,54 mol.mol<sup>-1</sup> para a fermentação com 10 g.L<sup>-1</sup> de glicerol. Quando na fermentação continha 30 g.L<sup>-1</sup> de glicerol, a mesma utilizada por Pinto (2009), o rendimento obtido foi 0,29 mol.mol<sup>-1</sup> para a conversão de glicerol em 1,3-PDO. Essa diferença pode ser atribuída as diferentes condições do processo como controle de pH, temperatura e volumes maiores do meio de cultivo. Diversos autores na literatura relatam que diferentes condições de processos para diversas linhagens de *C. butyricum* interferem diretamente na produção de 1,3 PDO (GUNZEL *et al.*, 1991; SAINT-AMANS *et al.*, 1994; HIMMI *et al.*, 1999).

Neste trabalho com o *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 o melhor rendimento para a produção de 1,3-PDO foi 0,54 mol.mol<sup>-1</sup> e concentração final de 4,5 de 1,3-PDO. Estes resultados foram obtidos para a fermentação com concentração de glicerol P.A. inicial foi 10,0 g.L<sup>-1</sup> e concordam com os obtidos Himmi *et al.* (1999). Eles utilizaram em seu trabalho 20,0 g.L<sup>-1</sup> de glicerol P.A. com *Clostridium butyricum* CNCM 1211 em fermentação em batelada com biorreator, tendo produzido de 11 g.L<sup>-1</sup> de 1,3-PDO e rendimento de 0,63 mol.mol<sup>-1</sup>. As semelhanças entre os trabalhos está no fato de a menor concentração de glicerol utilizada na fermentação apresentar o maior rendimento de produção do 1,3-PDO, pois Himmi *et al.* (1999) trabalharam com concentrações de 20 a 120 g.L<sup>-1</sup> de glicerol.

Um fator importante em processos fermentativos é a possível interferência que os efeitos inibitórios por parte do substrato e dos produtos da fermentação podem causar sobre o crescimento microbiano. Segundo Biebl (2001), quando a fonte de carbono está em excesso, os produtos formados serão aqueles que causam menor inibição, ou seja, 1,3-PDO e ácido acético.

No presente trabalho pode ter havido a inibição por parte do glicerol no crescimento celular e produção do 1,3-PDO. Essa observação pode ser feita pois nas fermentações com os micro-organismos *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 e *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 a menor concentração de glicerol utilizada, 10,0 g.L<sup>-1</sup> apresentou os melhores resultados.

Para as fermentações realizadas em batelada com as cepas de *Clostridium butyricum* DSM 5431, B593, VPI 3266, o rendimento global máximo alcançado,  $Y_{P/S}$ ,

foi em torno de  $0,60 \text{ mol.mol}^{-1}$ . González-Pajuelo *et al.* (2004) obteve rendimento na fermentação de 0,62 moles de 1,3-PDO produzidos por moles de glicerol consumido pelo *Clostridium butyricum* VPI 3266.

Melhores resultados para a produção de 1,3-PDO podem ser obtidos a partir de seleção de linhagens de micro-organismos produtoras naturais de 1,3-PDO, manipulação genética, diferentes processos fermentativos, além da avaliação de diferentes parâmetros da fermentação (GONZÁLEZ-PAJUELO *et al.*, 2005a; 2005b; ZENG, 1996).

Os resultados dos rendimentos deste trabalho foram 0,24; 0,15 e  $0,55 \text{ mol.mol}^{-1}$  para a fermentação com concentração inicial de glicerol de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  estão apresentados na Tabela 13. A fermentação que obteve  $0,55 \text{ mol.mol}^{-1}$  de conversão de glicerol em 1,3-PDO pelo *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 foi o melhor resultado estando de acordo com resultados de trabalhos da literatura como o de Himmi *et al.* (1999), Reimann *et al.* (1998a), Taconi *et al.* (2009) utilizando diferentes linhagens de *Clostridium butyricum* que obtiveram rendimentos de 1,3-PDO produzido por glicerol consumido de 0,69, 0,63 e  $0,50 \text{ mol.mol}^{-1}$ , respectivamente.

Diante dos resultados obtidos das fermentações com as diferentes linhagens do *Clostridium* a que apresentou melhor resultado foi a que utilizou o micro-organismo *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 obtendo um rendimento de  $0,544 \text{ mol.mol}^{-1}$  de 1,3-PDO produzido por glicerol consumido como apresentado na Tabela 13.

**Tabela 13 – Parâmetros da fermentação do glicerol P.A. por linhagens de *Clostridium*.**

Linhagem	Fermentação	$C_S^{\text{a}}$	$Y_{P/S}^{\text{b}}$
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 4259	Batelada	10	0,240
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Batelada	10	0,153
<i>Clostridium butyricum</i> DSMZ 10702	Batelada	10	0,544

<sup>a</sup> Concentração de glicerol inicial ( $S$ ) em  $\text{g.L}^{-1}$ .

<sup>b</sup> Rendimento de 1,3-propanodiol ( $P$ ) por glicerol ( $S$ ) consumido em  $\text{mol.mol}^{-1}$ .

O que se observa em trabalhos sobre produção de bioproductos é que o tipo de processo pode influenciar diretamente no rendimento da fermentação. O processo fermentativo realizado nesse trabalho foi o processo descontínuo, que é caracterizado pela alteração das condições do meio de cultivo a todo instante do bioprocesso, como diminuição das concentrações de nutrientes e o aumento do número de células, de

produtos e de subprodutos. O principal problema desse processo são os fenômenos de inibição pelo substrato, pelo produto e por outros metabólitos. Por exemplo, em elevadas concentrações de substrato o efeito está relacionado a fenômenos osmóticos que resultam na plasmólise celular. Outro fator é que o micro-organismo durante seu metabolismo gera produtos, que podem interferir no seu crescimento e eventualmente em sua viabilidade, que é conhecido como inibição pelo substrato (PEREIRA JR *et al.*, 2008).

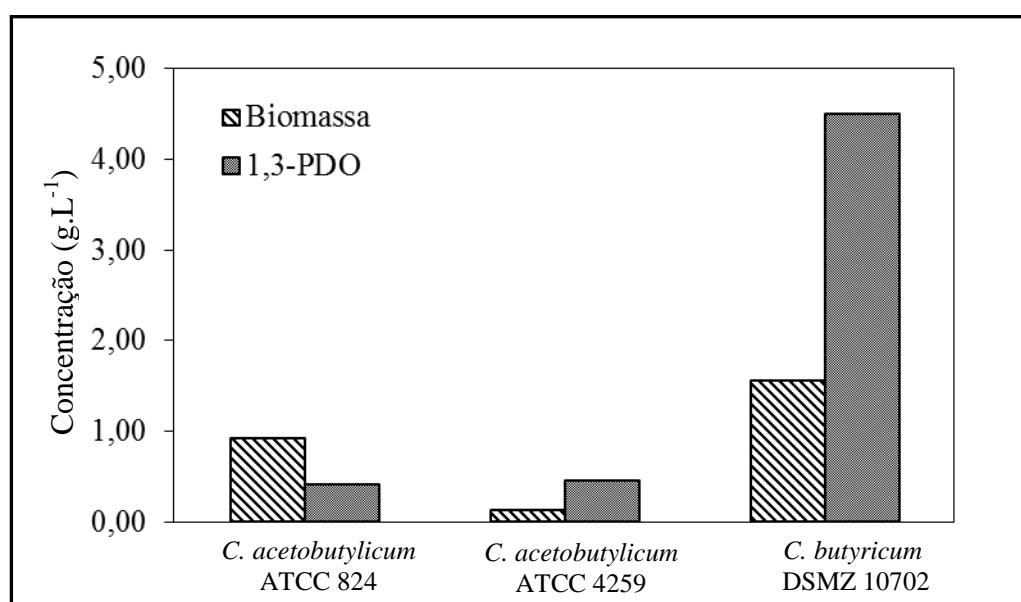
Uma hipótese de que os resultados da fermentação nas condições do processo adotadas no presente estudo podem ter sido responsáveis pelo desvio metabólico na produção de 1,3 PDO. Os micro-organismos podem ter sido expostos a algum tipo de estresse que interferiu no seu metabolismo. Dos possíveis estresses, os quais o micro-organismo podem ser submetidos, dois são considerados os mais importantes: estresse osmótico causado pela alta concentração do substrato (glicerol) e o estresse associado a presença de toxinas e inibidores (produtos da fermentação e impurezas do glicerol bruto) (KUBIAK *et al.*, 2012).

Diversos trabalhos, Biebl (1991), Zeng *et al.* (1994), Reimann *et al.* (1998a, 1998b), relatam a inibição da fermentação do glicerol em relação a concentração de 1,3-PDO durante a fermentação. A influência da concentração inicial e da concentração final de 1,3-PDO na fermentação do glicerol sugere que a quantidade desse diol e outros alcoóis apresentam maior interferência no crescimento do micro-organismo do que na conversão do glicerol a 1,3-PDO (COLIN *et al.*, 2000). O fenômeno de inibição ocasionado pelo 1,3-PDO no *Clostridium butyricum* pode modificar a organização celular causada pelo aumento da fluidez da membrana (JAIN *et al.*, 1978; LINDEN e MOREIRA, 1982) e outra suposição é sobre o transporte através da membrana pelo álcool no *Clostridium acetobutylicum* (SHIMIZU e KATSURA, 1998).

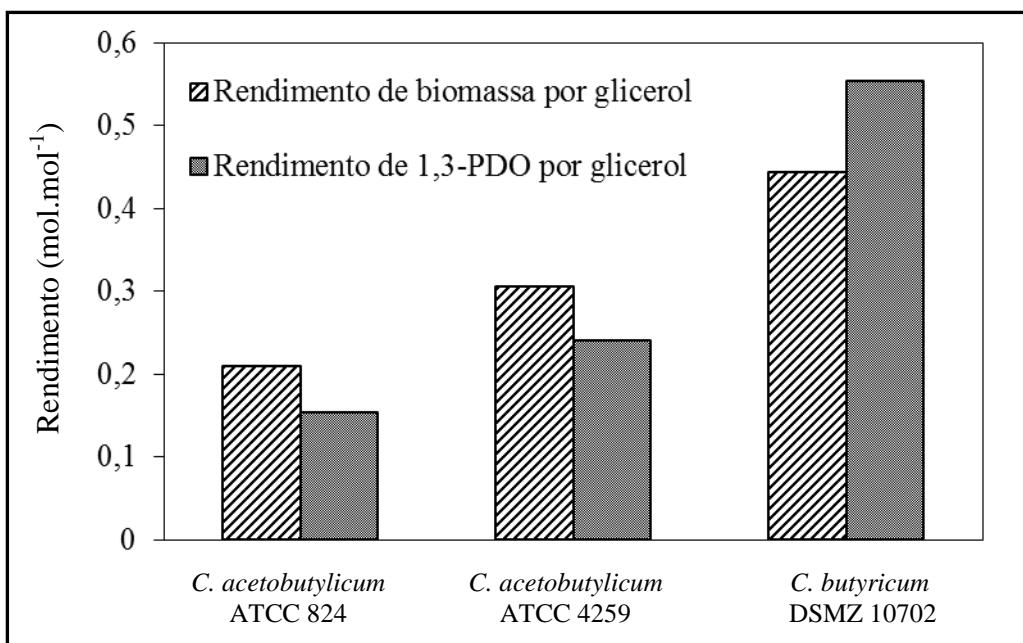
O micro-organismo *Clostridium* quando cresce num substrato mais reduzido que a glicose, como o glicerol, observa-se que o poder redutor não é usado para a formação do hidrogênio molecular, mas é usado para formar compostos com maior poder redutor, como o 1,3-PDO (BIEBL *et al.*, 1992; HEYNDRICKX *et al.*, 1991). A mesma quantidade de glicerol libera duas vezes mais moléculas de NADH<sub>2</sub> que a glicose. O excesso dos equivalentes redutores provém da conversão do glicerol em piruvato e pode ser oxidado através da etapa de consumo do NADH<sub>2</sub> observado na via metabólica Figura 6 (GIRBAL *et al.*, 1995a).

A identificação e quantificação dos outros produtos formados durante a fermentação do glicerol pelo *Clostridium* se torna necessário para avaliar alternativas para favorecer a rota metabólica para a maior formação do 1,3-PDO. A adição de substâncias que possam fornecer mais agentes redutores para a produção do 1,3-PDO, como o ácido para-aminobenzóico (vitamina B<sub>12</sub>), biotina, se torna-se um opção para essa melhoria (CÁRDENAS *et al.*, 2006; CELINSKA, 2010; SAXENA *et al.*, 2009).

Nas condições operacionais neste estudo, regime em batelada, temperatura em torno de 35°C, sem agitação, sem controle de pH, os micro-organismos se adaptaram melhor na menor concentração de glicerol utilizada, 10 g.L<sup>-1</sup>, apresentando rendimentos na conversão do glicerol em 1,3-PDO de 0,24 mol.mol<sup>-1</sup>, 0,15 mol.mol<sup>-1</sup> e 0,55 mol.mol<sup>-1</sup> para o *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259, *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 e *Clostridium butyricum* DSMZ 10702, respectivamente (Figuras 23 e 24). Sendo o rendimento o principal parâmetro a ser avaliado num processo fermentação, é importante conhecer a quantidade de glicerol ideal utilizada no início da fermentação pois, garante que todo ou quase todo substrato seja utilizado pelo micro-organismo tanto para o seu crescimento quanto para a produção do produto de interesse.



**Figura 23** – Produção de 1,3-PDO e crescimento de biomassa das linhagens de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 e ATCC 4259 e *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 em 72 horas de fermentação com 10 g.L<sup>-1</sup> de glicerol P.A.



**Figura 24** – Rendimentos das linhagens de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 e ATCC 4259 e *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 em 72 horas de fermentação com 10 g.L<sup>-1</sup> de glicerol P.A.

A partir dos rendimentos da fermentação do glicerol P.A. na produção do 1,3-PDO pelo *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 pode-se confirmar que esse micro-organismo apresentou os melhores resultados. Sendo assim, este foi selecionado para realizar um planejamento experimental com todos os componentes presentes no meio de cultura e otimizar os valores obtidos para a produção de 1,3-PDO a partir da conversão do glicerol e posteriormente aplicar a melhor condição de cultivo para a fermentação do glicerol bruto oriundo do biodiesel.

#### 4.4 PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN

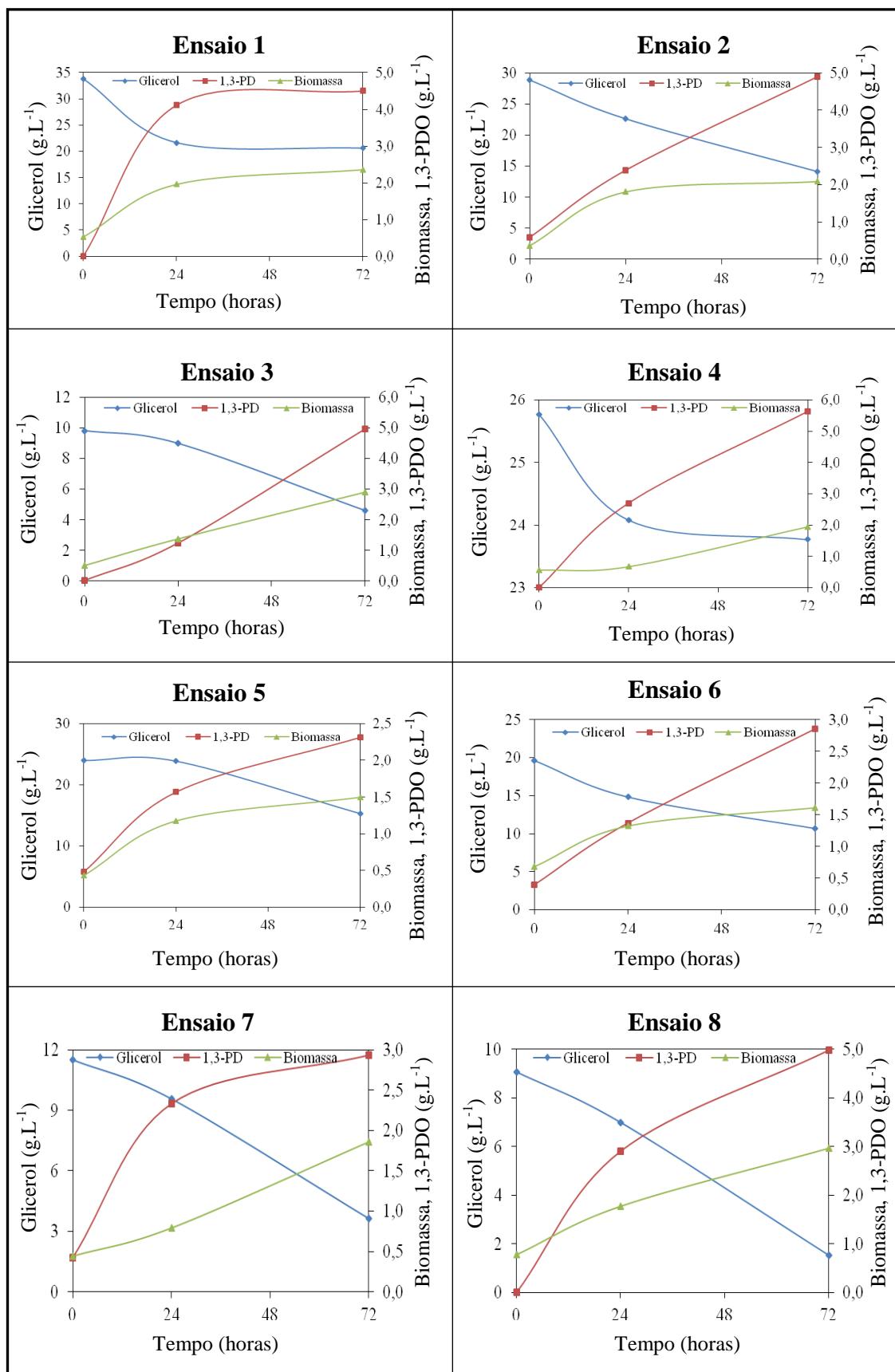
Esse tipo de planejamento, o Plackett-Burman, assume que não há interação entre as diferentes variáveis avaliadas. As variáveis são analisadas individualmente para se conhecer quais podem influenciar negativa ou positivamente no processo de produção do 1,3-PDO pelo *Clostridium butyricum* DSMZ 10702. Desta forma se torna possível definir as próximas etapas para otimização.

Com a finalidade de melhorar o rendimento da produção de 1,3-PDO, foi realizado uma seleção através do planejamento experimental Plackett-Burman, para identificar os componentes do meio de cultivo que influencia no processo fermentativo. O meio de cultivo deve conter os nutrientes necessários para favorecer o crescimento

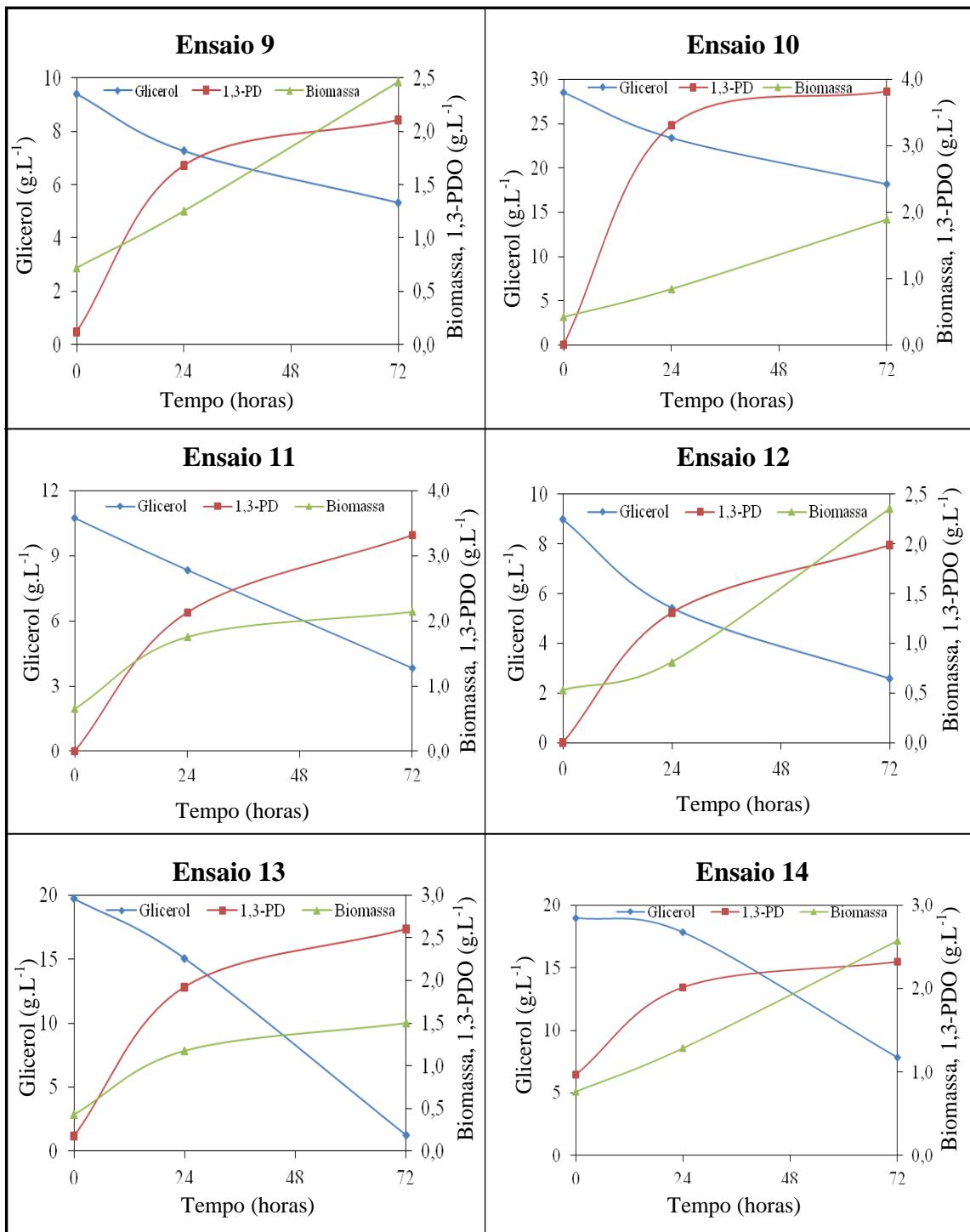
microbiano além da formação do produto. Portanto, definir quais compostos farão parte desse meio de cultivo e as quantidades de cada um é uma etapa que deve ser muito bem avaliada. Nos trabalhos de Biebl e Pfennig (1981), Heyndrickx *et al.* (1991) e Saint-Amans *et al.* (1994) as alterações do meio de cultivo proporcionaram o crescimento inicial mais rápido do micro-organismo e aumento dos rendimentos de biomassa para os *Clostridium* produtores de 1,3-PDO.

O planejamento experimental Plackett-Burman foi utilizado para avaliar a influência do glicerol, pH, extrato de levedura, PABA, diversos sais inorgânicos na produção do 1,3-PDO pelo *Clostridium butyricum* DSMZ 10702. As variáveis e seus valores foram baseados em trabalhos da literatura (BIEBL *et al.*, 1992; 1995; 1999; CÁRDENAS *et al.*, 2006; GUNZEL *et al.*, 1991). De acordo com essa análise estatística foi possível determinar as melhores condições de cultivo e obter resultados mais satisfatórios para a produção do 1,3-PDO.

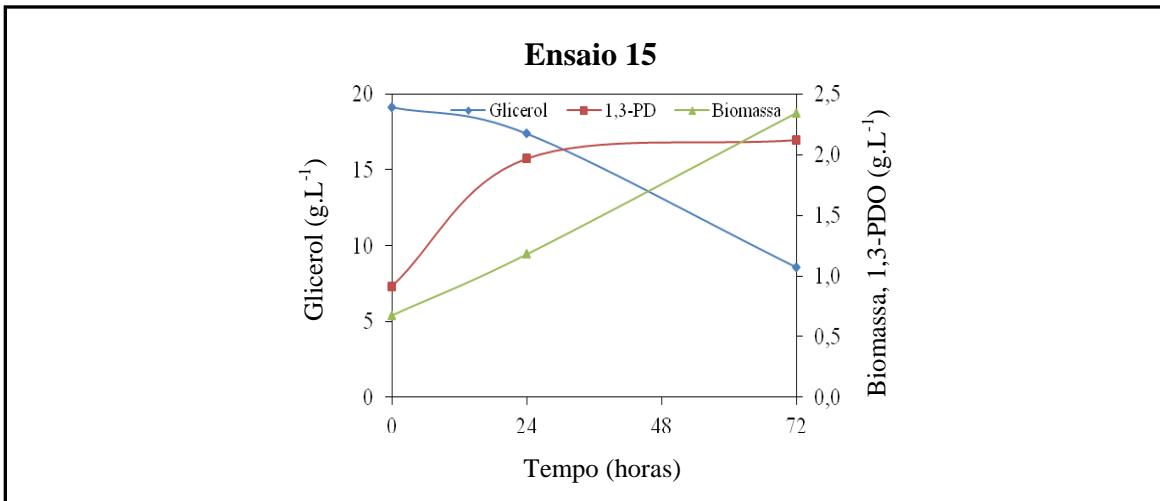
Os ensaios da fermentação do glicerol P.A. forneceram os resultados para a construção da Tabela de ensaios (Tabela 14) do planejamento Plackett-Burman e os perfis da fermentação estão apresentados na Figura 25.



**Figura 25** – Perfis cinéticos da fermentação do glicerol pelo *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 dos ensaios do planejamento experimental Plackett-Burman (continua).



**Figura 25 – Continuação.**



**Figura 25** – Continuação.

A Tabela 14 apresenta as oito variáveis independentes e seus respectivos valores altos e baixos utilizados no estudo estatístico, dos 12 ensaios e 3 pontos centrais e os resultados do 1,3-PDO ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) produzido, crescimento celular ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) e glicerol residual ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) de acordo com a Figura 25. Vale lembrar que o planejamento Plackett-Burman assume que não há interação entre as diferentes variáveis, uma vez que a aproximação linear é suficiente para o planejamento.

**Tabela 14** – Ensaios do Planejamento Plackett-Burman tendo como resposta o consumo de glicerol ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), produção de 1,3-PDO ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) e crescimento de biomassa ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) em 72 horas de fermentação.

Ensaio	Variáveis							Respostas									
								Glicerol ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )			1,3-PDO ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )			Biomassa ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )			
	glicerol ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Extrato de levedura ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$\text{K}_2\text{HPO}_4$ ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	PABA ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	pH (pH)	0 (horas)	24 (horas)	72 (horas)	0 (horas)	24 (horas)	72 (horas)	0 (horas)	24 (horas)	72 (horas)
1	(30) 1	(0) -1	(1,6) 1	(0) -1	(0) -1	(0,5) -1	(0,008) 1	(8,0) 1	33,85	21,65	20,59	0,00	4,12	4,50	0,52	1,96	2,36
2	(30) 1	(2,0) 1	(0,03) -1	(0,5) 1	(0) -1	(0,5) -1	(0) -1	(6,0) -1	28,88	22,63	14,10	0,58	2,39	4,90	0,36	1,81	2,09
3	(10) -1	(2,0) 1	(1,6) 1	(0) -1	(0,5) 1	(0,5) -1	(0) -1	(6,0) -1	9,82	8,98	4,61	0,75	1,24	<b>4,97</b>	0,51	1,38	<b>2,90</b>
4	(30) 1	(0) -1	(1,6) 1	(0,5) 1	(0) -1	(1,5) 1	(0) -1	(6,0) -1	25,77	23,77	17,46	0,00	1,43	2,70	0,57	0,68	1,94
5	(30) 1	(2,0) 1	(0,03) -1	(0,5) 1	(0,5) 1	(0,5) -1	(0,008) 1	(6,0) -1	23,85	23,96	15,27	0,48	1,57	2,31	0,43	1,18	1,50
6	(30) 1	(2,0) 1	(1,6) 1	(0) -1	(0,5) 1	(1,5) 1	(0) -1	(8,0) 1	19,66	14,84	10,68	0,39	1,37	2,85	0,68	1,32	1,61
7	(10) -1	(2,0) 1	(1,6) 1	(0,5) 1	(0) -1	(1,5) 1	(0,008) 1	(6,0) -1	11,50	9,56	3,65	0,42	2,34	2,94	0,44	0,79	1,86
8	(10) -1	(0) -1	(1,6) 1	(0,5) 1	(0,5) 1	(0,5) -1	(0,008) 1	(8,0) 1	9,07	6,99	1,54	0,00	2,91	<b>4,99</b>	0,79	1,78	<b>2,97</b>
9	(10) -1	(0) -1	(0,03) -1	(0,5) 1	(0,5) 1	(1,5) 1	(0) -1	(8,0) 1	9,39	7,26	5,32	0,12	1,68	2,10	0,72	1,26	2,47
10	(30) 1	(0) -1	(0,03) -1	(0) -1	(0,5) 1	(1,5) 1	(0,008) 1	(6,0) -1	28,53	23,42	18,21	0,00	3,31	3,82	0,42	0,84	1,89
11	(10) -1	(2,0) 1	(0,03) -1	(0) -1	(0) -1	(1,5) 1	(0,008) 1	(8,0) 1	10,73	8,34	3,82	0,00	2,13	3,31	0,66	1,76	2,14
12	(10) -1	(0) -1	(0,03) -1	(0) -1	(0) -1	(0,5) -1	(0) -1	(6,0) -1	8,98	5,43	2,60	0,00	1,31	1,99	0,53	0,81	2,36
13 (C)	(20) 0	(1,0) 0	(0,08) 0	(0,25) 0	(0,25) 0	(1,0) 0	(0,004) 0	(7,0) 0	19,73	15,06	9,27	0,17	1,93	2,60	0,59	1,24	2,37
14 (C)	(20) 0	(1) 0	(0,08) 0	(0,25) 0	(0,25) 0	(1,0) 0	(0,004) 0	(7,0) 0	18,99	17,82	7,82	0,97	2,02	2,32	0,77	1,29	2,58
15 (C)	(20) 0	(1,0) 0	(0,08) 0	(0,25) 0	(0,25) 0	(1,0) 0	(0,004) 0	(7,0) 0	19,13	17,40	8,58	0,92	1,97	2,12	0,68	1,18	2,34

Diante das respostas apresentadas na Tabela 14, observou-se que a maior produção de 1,3-PDO ocorreu no intervalo de tempo entre 24 e 72 horas, bem como o aumento de biomassa, alcançando o maior valor em 72 horas de fermentação. Analisando a Figura 25 observa-se que nas primeiras 24 horas as curvas que representam o crescimento celular e a produção de 1,3-PDO apresentaram característica linear.. Essa análise confirma que o 1,3-PDO é um metabólito primário, sendo que a sua produção acompanha o crescimento do micro-organismo (SAXENA *et al.*, 2009).

As Tabelas 15, 16 e 17 apresentam as análises estatísticas das variáveis estudadas para o produção de 1,3-PDO, produção de biomassa e consumo de glicerol, respectivamente. Na produção do 1,3-PDO verifica-se que o glicerol, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, PABA e o pH exercem ua influencia significativa, indicando que na faixa estudada favorece a produção de 1,3-PDO. No caso do extrato de levedura, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> podem ser mantido nas concentrações mínimas, ou até mesmo serem retirados da composição do meio, o que no caso de aplicação industrial favorece na redução de custos.

**Tabela 15** – Efeito individual das 8 variáveis analisadas na produção do 1,3-PDO em 72 horas de fermentação.

Fatores	Efeitos	Erro padrão	t	p valor
*Glicerol	0,488713	0,415309	1,17675	0,292261
*Extrato de levedura	-0,560187	0,415309	-1,34884	0,235254
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,109520	0,415309	0,26371	0,802528
*KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-0,133187	0,415309	-0,32069	0,761412
*FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-0,334046	0,415309	-0,80433	0,457726
*(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-0,274380	0,415309	-0,66066	0,538046
*PABA	1,097854	0,415309	2,64346	0,045785
*pH inicial	0,364579	0,462725	0,78789	0,466451

(\*) = significativo, R<sup>2</sup> = 0,72785

**Tabela 16** – Efeito individual das 8 variáveis analisadas para a produção de biomassa em 72 horas de fermentação.

Fatores	Efeitos	Erro padrão	t	p valor
Glicerol	0,125751	0,164263	0,76555	0,478505
*Extrato de levedura	0,272451	0,164263	1,65863	0,158088
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-0,079685	0,164263	-0,48510	0,648110
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,024585	0,164263	0,14967	0,886878
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-0,129451	0,164263	-0,78807	0,466356
*(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-0,500151	0,164263	-3,04482	0,028593
PABA	0,053315	0,164263	0,32457	0,758643
*pH inicial	0,729407	0,183017	3,98545	0,010474

(\*) = significativo, R<sup>2</sup> = 0,82741

**Tabela 17** – Efeito individual das 8 variáveis analisadas no consumo de glicerol em 72 horas de fermentação.

Fatores	Efeitos	Erro padrão	t	p valor
*Glicerol	13,48729	1,469295	9,17943	0,000257
Extrato de levedura	-0,49671	1,469295	-0,33806	0,749048
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-0,41229	1,469295	-0,28060	0,790256
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,45762	1,469295	0,99205	0,366723
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-0,52529	1,469295	-0,35751	0,735306
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,05238	1,469295	0,03565	0,972941
PABA	2,29771	1,469295	1,56382	0,178626
pH inicial	-2,77029	1,637048	-1,69225	0,151383

(\*) = significativo, R<sup>2</sup> = 0,95331

Analizando a Tabela 15 verifica-se que o glicerol é a variável mais importante a ser analisada, pois o 1,3-PDO é produzido a partir da conversão do glicerol. As maiores produções de 1,3-PDO foram alcançadas quando a concentração de glicerol foi fixada no nível baixo com o valor de 10 g.L<sup>-1</sup>, mostrando que o *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 apresentou a capacidade de degradar o glicerol na concentração mais baixa. Trabalhos na literatura como o do Chatzifragkou *et al.* (2011) estudaram o efeito da inibição na produção do 1,3-propanodiol pelo substrato, no qual foi utilizado 20 g.L<sup>-1</sup> de glicerol na fermentação com *Clostridium butyricum* VPI 1718, alcançando o rendimento da conversão de glicerol em 1,3-PDO entre 0,52 a 0,56 g.g<sup>-1</sup>.

Além da fonte de carbono, o PABA (vitamina B<sub>12</sub>) apresentou efeito positivo na produção de 1,3-PDO, pois a enzima responsável pela conversão do glicerol a 1,3-PDO é dependente da coenzima B<sub>12</sub>. Cárdenas *et al.* (2006) em seu trabalho avaliaram o uso do PABA no meio de cultivo nas concentrações de 0,3 a 3 mg.L<sup>-1</sup> para favorecer a

produção do 1,3-PDO, pois de acordo com alguns autores a atividade de algumas enzimas envolvidas na rota metabólica, como a 1,3-propanodiol oxidoreductase é diretamente dependente da vitamina B<sub>12</sub> (LUERS *et al.*, 1997; RAYNAUD *et al.*, 2003; REIMANN *et al.*, 1996 e 1998a).

O perfil cinético de produção de 1,3-PDO é similar ao de biomassa, pois à medida que ocorre o crescimento celular, observa-se o aumento da concentração de 1,3-PDO com o tempo. Os ensaios que contém o extrato de levedura apresentaram maior produção de 1,3-PDO, e no meio na ausência do extrato de levedura a menor produção de 1,3-PDO, respectivamente 2,39 g.L<sup>-1</sup> (ensaio 1) e 1,43 g.L<sup>-1</sup> (ensaio 4). Embora a presença do extrato de levedura seja um fator importante para a produção de biomassa, esse componente nutricional interfere metabolicamente na produção de 1,3-PDO, sendo considerada uma variável importante.

O pH inicial teve efeito positivo na produção do 1,3-PDO, sendo que os melhores resultados foram para o nível alto (8,0) e baixo (6,0). Assim, pode-se concluir que a faixa de intervalo trabalhada foi suficiente para a produção do 1,3-PDO. Esperava-se que um pH inicial mais elevado seria necessário tendo em vista que há um decréscimo do mesmo durante o processo fermentativo, devido a formação dos produtos. Após as 72 horas de fermentação o pH permaneceu entre 5,0 – 5,5 o que não afetou a atividade da enzima para a produção do 1,3-PDO.

O extrato de levedura, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tiveram efeito na produção do 1,3-PDO conforme apresentado na Tabela 15. É importante ressaltar que o extrato de levedura e o FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O poderiam ser utilizados em baixas concentrações, o que não interferem na produção.

Em relação à produção de biomassa (Tabela 16), o extrato de levedura apresentou uma influência significativa, indicando que quanto maior a concentração, o crescimento se torna mais eficiente, já que durante o processo fermentativo o micro-organismo poderia consumir primeiro o extrato de levedura, por ser um nutriente mais facilmente assimilável pelo micro-organismo, para em seguida consumir o glicerol. Esses resultados também foram obtidos por Chatzifragkou *et al.* (2011) e Ringel *et al.* (2012).

Uma das finalidades do presente estudo foi avaliar a possibilidade de realizar o processo fermentativo sem a presença do extrato de levedura, induzindo o micro-organismo a consumir todo o glicerol com uma produção significativa de biomassa. Os resultados demonstraram que a presença do extrato de levedura apesar de ter uma

influência significativa, poderia ser retirado sem trazer grandes comprometimentos ao processo fermentativo (Tabela 14), resultados estes observados nos ensaios 01 (glicerol 30 g.L<sup>-1</sup> e extrato de levedura 0 g.L<sup>-1</sup>) e 02 (glicerol 30 g.L<sup>-1</sup> e extrato de levedura 2 g.L<sup>-1</sup>) e ensaios 07 (glicerol 10 g.L<sup>-1</sup> e extrato de levedura 2 g.L<sup>-1</sup>) e 08 (glicerol 10 g.L<sup>-1</sup> e extrato de levedura 0 g.L<sup>-1</sup>). Essa avaliação é importante, pois é de interesse que o micro-organismo consuma todo ou o máximo que for capaz do glicerol presente no meio de cultivo, constituindo assim a sua única fonte de carbono.

O pH do meio de cultivo apresentou influencia significativa no crescimento de biomassa (Tabela 16). Dabrock *et al.* (1992) também observaram que o pH inicial igual a 8,0 apresentou efeito positivo para o aumento de biomassa sendo que um pH mais elevado foi necessário, pois durante a fermentação ocorre o decréscimo do mesmo, podendo comprometer a a rota metabólica do micro-organismo.

A fonte inorgânica de nitrogênio, o (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, teve efeito na produção de biomassa, podendo utilizar numa concentração mínima. Este resultado concorda com o obtido por Moon *et al.* (2011), que em seu trabalho verificaram a partir do planejamento experimental que para a produção do 1,3-PDO pelo *Clostridium pasteurianum*, foi observado o efeito dessa fonte inorgânica de nitrogênio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), indicando sua baixa influencia na produção de biomassa podendo ser mantido na concentração mínima ou retirado, ao contrario do extrato de levedura.

Analizando as variáveis que apresentaram efeito significativo no consumo de glicerol de acordo com a Tabela 17, observou-se apenas que o glicerol interferiu positivamente no consumo do mesmo, sendo que esse consumo compromete diretamente a produção do 1,3-PDO, como esperado já que é o substrato limitante da fermentação.

Na Tabela 14 também pode-se observar que na maior concentração de glicerol (30 g.L<sup>-1</sup>) o micro-organismo *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 não conseguiu assimilar o substrato facilmente podendo levar a inibição no crescimento do micro-organismo e consequentemente diminuição na produção do 1,3-PDO. Diante dos valores apresentados na Tabela 14, os ensaios 3 e 8, com concentração inicial de 10 g.L<sup>-1</sup> de glicerol apresentaram melhores resultados na produção do 1,3-PDO. Esses resultados confirmaram que a concentração inicial de 10 g.L<sup>-1</sup> de glicerol é a ideal para os melhores rendimentos em 1,3-PDO, mesmo alterando a composição e a concentração dos nutrientes presentes no meio de cultivo.

Recentemente, Moon *et al.* (2011) apresentaram em seus resultados a otimização do meio de cultivo a partir de um planejamento experimental. O objetivo do trabalho foi determinar as concentrações dos componentes do meio que favoreceram a produção de butanol e 1,3-propanodiol na fermentação em batelada pelo *Clostridium pasteurianum*. A partir de alguns componentes, como ferro, sulfatos e extrato de levedura foi possível determinar quais apresentaram efeito significativo na produção do 1,3-propanodiol. O meio de cultivo que apresentou a melhor produção do 1,3-PDO não continha sulfato de ferro e nitrogênio inorgânico, sendo que apenas o extrato de levedura apresentou influência significativa.

A maioria dos meios de cultivo utilizados na conversão bacteriana de glicerol a 1,3-PDO são semi-sintético/sintético e baseado num complexo de minerais. Biebl e Pfennig (1981) realizaram o trabalho com culturas de *Clostridium* com a finalidade de produzir o 1,3-PDO em meio de cultivo constituído por compostos minerais ( $1\text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $1\text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $2\text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4$ ,  $0,5\text{ g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $0,2\text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$ ,  $15\text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{FeSO}_4$ ,  $5\text{ mg.L}^{-1}\text{CaCO}_3$ ) e  $2\text{ g.L}^{-1}$  de extrato de carne. Também para se determinar os nutrientes adicionais necessários a fermentação do glicerol pelo *Clostridium butyricum*, uma mistura de biotina foi adicionada ao meio. Os resultados demonstraram que  $4,0\text{ g.L}^{-1}$  de biotina foram suficientes para o *Clostridium butyricum* converter  $129\text{ g.L}^{-1}$  do glicerol P.A. e  $121\text{ g.L}^{-1}$  do glicerol bruto em  $67\text{ g.L}^{-1}$  e  $65\text{ g.L}^{-1}$  de 1,3-PDO, respectivamente (HEYNDRICKX *et al.*, 1991; BIEBL e PFENNIG, 1981).

Neste trabalho também se avaliou os constituintes do meio de cultivo utilizado para a fermentação do glicerol P.A. pelo *Clostridium butyricum* DSMZ 10702, com a finalidade de determinar as melhores concentrações de cada nutriente. A partir desses resultados definiu-se o meio de cultivo que seria utilizado na fermentação do glicerol bruto.

#### 4.5 FERMENTAÇÃO DO GLICEROL BRUTO

Após realizar os ensaios do Planejamento Plackett-Burman e definir as melhores condições para a produção do 1,3-PDO a partir da fermentação do glicerol P.A. pelo *Clostridium butyricum* DSMZ 10702, novos ensaios foram realizados nessas mesmas condições. Porém utilizou-se na fermentação o glicerol bruto para avaliar a capacidade do micro-organismo em converter esse substrato em 1,3-PDO. Foram repetidos os ensaios 3 e 9 do planejamento Plackett-Burman (Tabela 14), pois esses apresentaram a

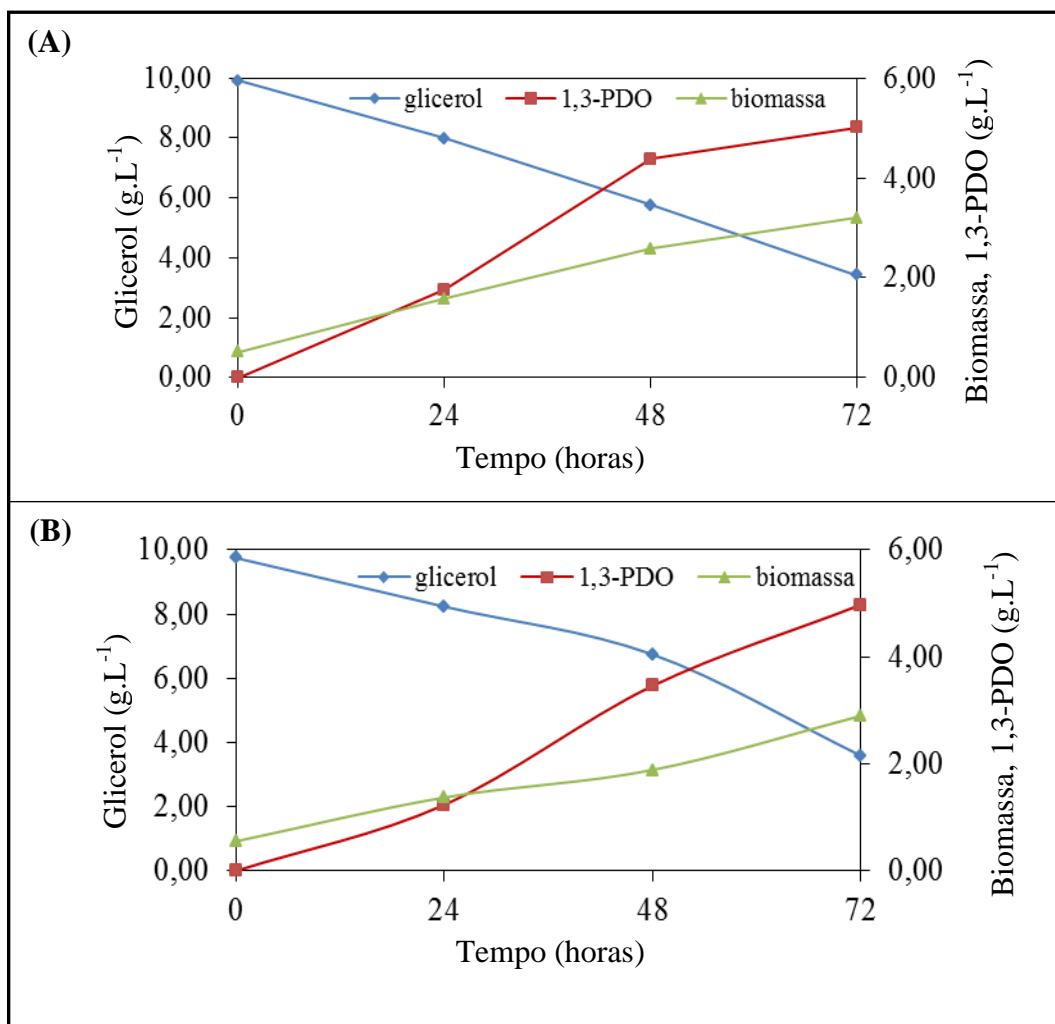
melhor produção do 1,3-PDO pelo micro-organismo. Nesses novos ensaios além de investigar a capacidade do *C. butyricum* DSMZ 10702 em metabolizar o glicerol bruto, foi também avaliada a interferência da agitação na fermentação do glicerol. A Tabela 18 apresenta as melhores condições de cultivo de acordo com os resultados do Planejamento Plackett-Burman.

**Tabela 18** – Meios de cultivo utilizados na fermentação do glicerol bruto pelo *Clostridium butyricum* DSMZ 10702.

Parâmetros	Ensaios			
	1	2	3	4
Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	10,0	10,0	10,0	10,0
Extrato de levedura (g.L <sup>-1</sup> )	2,0	2,0	0	0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	0,03	0,03	0,03	0,03
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	0,5	0,5	0,5	0,5
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g.L <sup>-1</sup> )	0,5	0,5	0,5	0,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	0,5	0,5	1,5	1,5
PABA (g.L <sup>-1</sup> )	0	0	0	0
pH inicial	6,0	6,0	8,0	8,0
Agitação	+	-	+	-

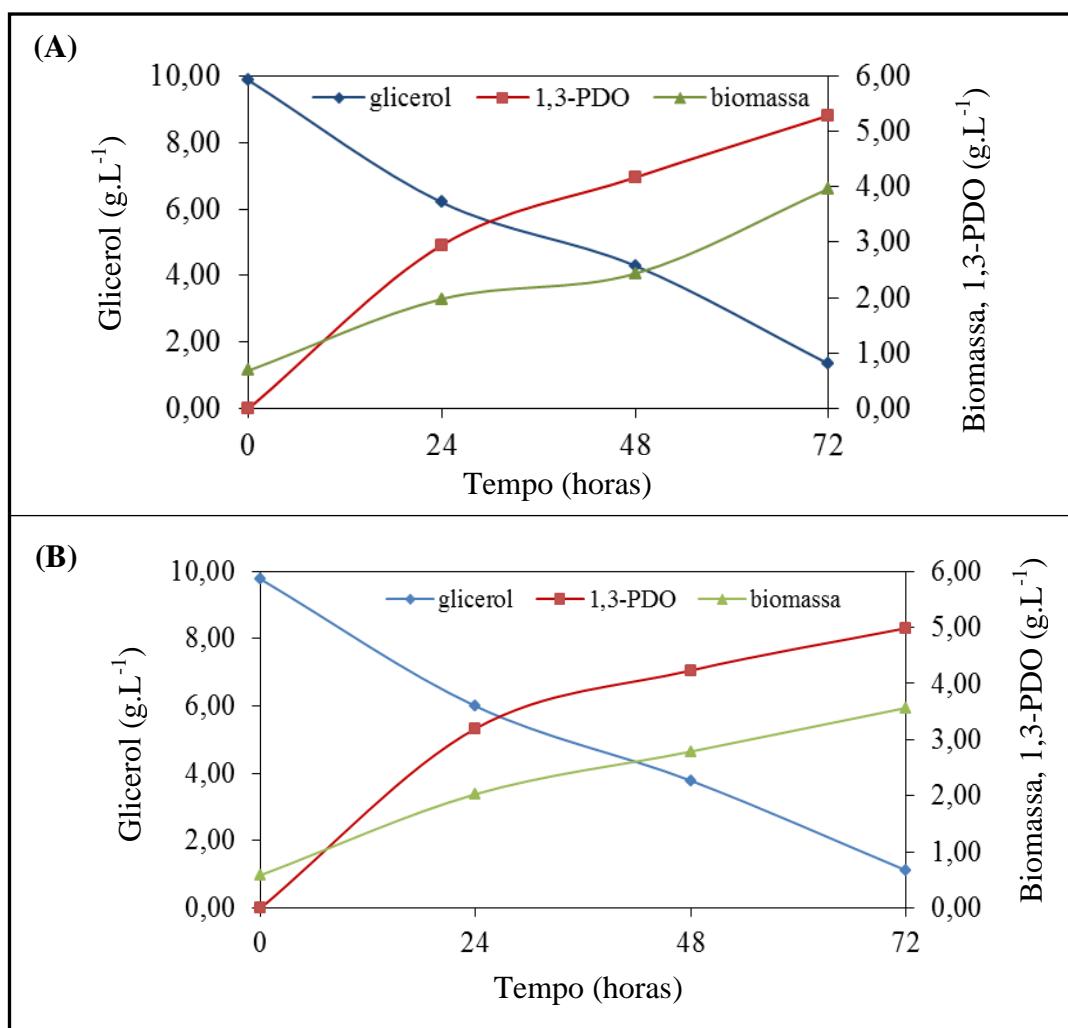
Legenda: (+) presença de agitação; (-) ausência de agitação.

As Figuras 26 e 27 apresentam os resultados das fermentações do glicerol bruto pelo *Clostridium butyricum* DSMZ 10702, nas condições definidas na Tabela 18.



**Figura 26** – Crescimento celular, consumo de glicerol bruto e produção de 1,3-PDO para *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 no (A) ensaio 1 e (B) ensaio 2.

A Figura 26 apresenta o perfil cinético das fermentações do glicerol bruto pelo *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 em meios de cultivo contendo o extrato de levedura. Os experimentos apresentados na Figura 25A foram realizados com agitação, enquanto os apresentados na Figura 26B foram realizados sem agitação. A produção do 1,3-PDO foi  $5,01 \text{ g.L}^{-1}$  e  $4,97 \text{ g.L}^{-1}$  para a fermentação com agitação e sem agitação, respectivamente e concentração de biomassa,  $3,2 \text{ g.L}^{-1}$  e  $2,9 \text{ g.L}^{-1}$ , nas mesmas condições citadas. O glicerol remanescente foi  $3,42 \text{ g.L}^{-1}$  para a fermentação com agitação (Figura 26A) e  $3,6 \text{ g.L}^{-1}$  para a fermentação sem agitação (Figura 26B). Os resultados mostram que a agitação não interferiu na capacidade do micro-organismo de crescer e converter o glicerol a 1,3-PDO.



**Figura 27** – Crescimento celular, consumo de glicerol bruto e produção de 1,3-PDO para *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 no (A) ensaio 3 e (B) ensaio 4.

Os resultados das fermentações do glicerol bruto pelo *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 com meio de cultivo sem a presença do extrato de levedura estão apresentados na Figura 27. A Figura 27A, apresenta o perfil cinético da fermentação com agitação, tendo produzido  $5,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de 1,3-PDO e  $4,98 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de 1,3-PDO para a fermentação sem agitação, Figura 27B.

O crescimento celular foi  $3,9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  e  $3,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  para as fermentações com agitação e sem agitação, respectivamente, e o glicerol remanescente foi  $1,34 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  e  $1,12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Na fermentação onde foi mantida a agitação o micro-organismo conseguiu consumir 86% do glicerol bruto, já na fermentação onde não houve agitação o consumo foi 88%, ou seja, a agitação praticamente não alterou os resultados.

**Tabela 19** – Rendimentos das culturas em batelada do *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 em glicerol P.A. e glicerol bruto nas mesmas condições em 72 horas de fermentação.

Ensaio	Tipo glicerol	Extrato de levedura	Agitação	$Y_{X/S}^a$	$Y_{P/S}^b$
3 (Planejamento PB)	P.A.	+	-	0,49	0,94
9 (Planejamento PB)	P.A.	-	-	0,47	0,88
1 (Validação)	Bruto	+	+	0,45	0,93
2 (Validação)	Bruto	+	-	0,42	0,90
3 (Validação)	Bruto	-	+	0,42	0,74
4 (Validação)	Bruto	-	-	0,36	0,68

Legenda: (+) presente, (-) ausente.

<sup>a</sup>Rendimento de biomassa ( $X$ ) por glicerol ( $S$ ) consumido em mol.mol<sup>-1</sup>

<sup>b</sup>Rendimento de 1,3-propanodiol ( $P$ ) por glicerol ( $S$ ) consumido em mol.mol<sup>-1</sup>

Os resultados dos rendimentos apresentados na Tabela 19 mostram que nas mesmas condições de fermentação do glicerol P.A. e bruto pelo micro-organismo *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 os resultados foram próximos para os substratos utilizados.

Ainda analisando a Tabela 19 pode-se concluir que nos ensaios com agitação, o resultado do rendimento do 1,3-PDO pelo consumo do glicerol foi 0,93 mol.mol<sup>-1</sup>, já no ensaio sem agitação o rendimento foi 0,94 mol.mol<sup>-1</sup> para os ensaios contendo extrato de levedura no meio de cultivo. Para os ensaios que não continham extrato de levedura no meio de cultivo a interferência da agitação mostrou-se semelhante pois, no ensaio com agitação o rendimento de 1,3-PDO pelo consumo do glicerol foi 0,74 mol.mol<sup>-1</sup> e no ensaio sem agitação foi 0,68 mol.mol<sup>-1</sup>. Sendo assim, a agitação do meio de cultivo para a fermentação do glicerol bruto pelo *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 não apresentou nenhuma melhora no processo fermentativo.

Outra análise que se pode fazer da Tabela 19 é com relação ao rendimento de biomassa. Este também apresentou comportamento similar ao rendimento do 1,3-PDO ou seja, a presença da agitação no meio de cultivo não apresentou melhoria nos resultados do rendimento. Nos ensaios que continham o extrato de levedura no meio de cultivo apresentaram rendimento de 0,45 mol.mol<sup>-1</sup> para o processo com agitação e 0,42 mol.mol<sup>-1</sup> para ausência da agitação. Já para os ensaios que não continham extrato de levedura no meio de cultivo os rendimentos foram 0,42 mol.mol<sup>-1</sup> e 0,36 mol.mol<sup>-1</sup> para os ensaios na presença de agitação e ausência de agitação, respectivamente.

Analisando a presença do extrato de levedura nas fermentações, pode-se observar que nas fermentações que continham esta fonte de carbono apresentaram

rendimento na produção de 1,3-PDO maiores, quando comparados aqueles que não continham. Os resultados dessa análise apresentados na Tabela 19 são  $0,74 \text{ mol.mol}^{-1}$  para o meio sem extrato de levedura e  $0,93 \text{ mol.mol}^{-1}$ , com extrato de levedura, sendo que ambas fermentações ocorreram com agitação. Este resultados podem ser atribuídos a capacidade do micro-organismo inicialmente consumir o extrato de levedura como uma fonte carbono mais facilmente assimilável, com a intenção de aumentar sua biomassa e em seguida utilizar o glicerol bruto outra fonte de carbono para seu crescimento e consequentemente para produção de 1,3-PDO.

Barbirato *et al.* (1998) em seu trabalho realizaram fermentação em batelada com *Clostridium butyricum* usando o glicerol bruto na concentração de  $112 \text{ g.L}^{-1}$ , foi obtido  $63,4 \text{ g.L}^{-1}$  de 1,3-propanodiol e a conversão de glicerol em 1,3-PDO foi  $0,69 \text{ mol.mol}^{-1}$ . Este resultado do rendimento confirma os obtidos neste trabalho que ficaram num intervalo de  $0,68$  a  $0,94 \text{ mol.mol}^{-1}$ , mostrando a capacidade do *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 em metabolizar o glicerol bruto.

Wilkens *et al.* (2012) compararam os resultados obtidos na fermentação com o glicerol puro e o bruto pelo micro-organismo *Clostridium butyricum* AKR102a. Na fermentação utilizando o glicerol puro obteve  $0,632 \text{ mol.mol}^{-1}$  de rendimento de 1,3-PDO produzido por glicerol puro consumido, e quando o substrato foi o glicerol bruto o rendimento foi bem próximo,  $0,622 \text{ mol.mol}^{-1}$  de rendimento de 1,3-PDO produzido por glicerol bruto consumido em 30 horas de fermentação.

Neste trabalho os rendimentos obtidos para a produção de 1,3-PDO pelo glicerol consumido pelo *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 confirmam com os obtidos com o Wilkens *et al.* (2012). A fermentação utilizando o glicerol P.A. e extrato de levedura obteve  $0,94 \text{ mol.mol}^{-1}$  e  $0,90 \text{ mol.mol}^{-1}$  de conversão do glicerol em 1,3-PDO, respectivamente, para o meio de cultivo com o glicerol bruto. Já nas fermentações que não continham o extrato de levedura e a única fonte de carbono era o glicerol P.A. e o bruto, os resultados foram  $0,88 \text{ mol.mol}^{-1}$  e  $0,68 \text{ mol.mol}^{-1}$ , respectivamente.

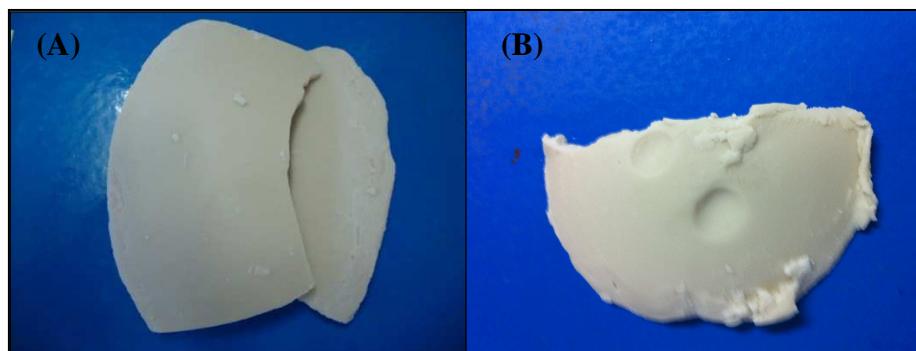
## 4.6 POLI(TEREFTALATO DE TRIMETILENO) - PTT

### 4.6.1 Obtenção do poli(tereftalato de trimetileno)

A concepção e construção do reator para a polimerização do PTT atendeu as condições necessárias para a realização da policondensação. A polimerização do PTT foi realizada utilizando os monômeros ácido tereftálico e 1,3-propanodiol, além do catalisador trióxido de manganês.

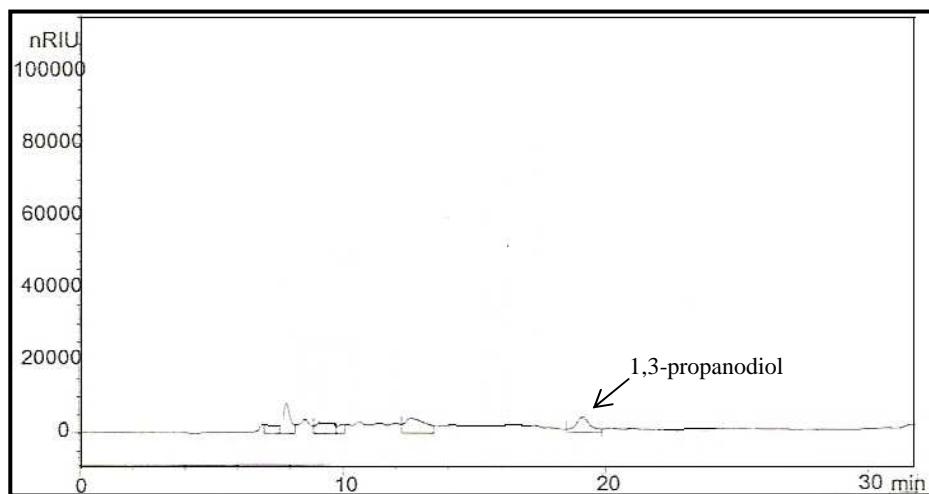
A construção da planta piloto em escala laboratorial para a síntese polimérica foi uma etapa fundamental para estabelecer todos os parâmetros necessários envolvidos na reação. Sendo assim, as primeiras bateladas do PTT foram produzidas a partir do 1,3-propanodiol comercial, para definir com precisão todas as condições experimentais adotadas.

Duas bateladas foram realizadas de acordo com as condições descritas no item 3.2.3, e os produtos obtidos estão apresentados na Figura 28.

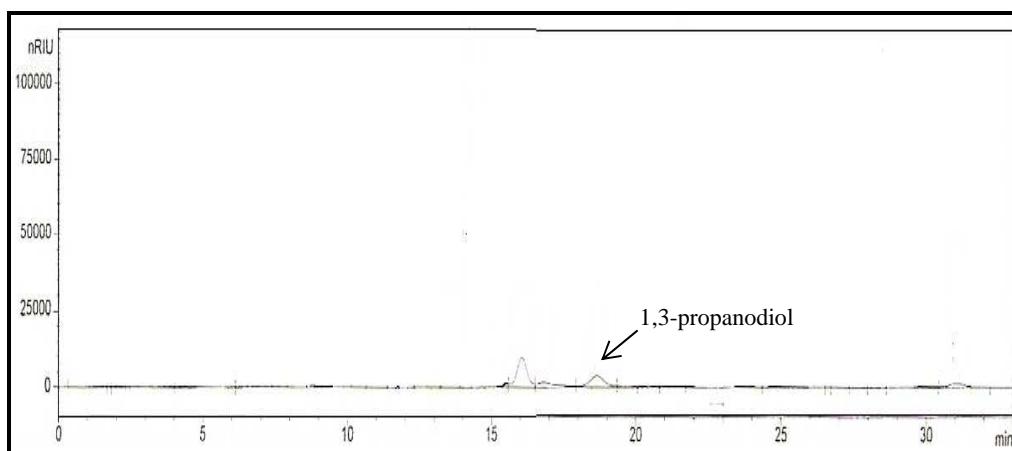


**Figura 28** – Poli(tereftalato de trimetileno) obtido pela reação de policondensação, (A) batelada 1 e (B) batelada 2.

A reação de policondensação descrita no item 4.2.3 ocorreu em aproximadamente 7 horas e as condições operacionais utilizadas foram as mesmas para as bateladas realizadas. A primeira etapa da reação teve a duração de 3 horas e 15 minutos e o restante da reação teve a duração de aproximadamente 4 horas. Ao final da reação foram coletados 60 mL de condensado. De acordo com a análise cromatográfica um dos produtos presentes nos condensados das duas bateladas realizadas foi o 1,3-propanodiol, como mostrado nas Figuras 29 e 30.



**Figura 29** – Cromatograma da amostra de condensado coletada ao final da reação de policondensação do PTT (batelada 1).



**Figura 30** – Cromatograma da amostra de condensado coletada ao final da reação de policondensação do PTT (batelada 2).

O condensado recolhido durante toda a polimerização foi a água que é o subproduto gerado durante a síntese do PTT, além do 1,3-PDO em excesso que também foi recolhido. Na reação de policondensação 1,3-PDO é colocado em excesso para garantir que todo ácido tereftálico reaja com o álcool formando o PTT, e assim não gere produtos intermediários. A coleta do condensado é fundamental para o acompanhamento da reação, sendo que quando não há mais coletado para ser recolhido concluiu-se que a reação de polimerização estava finalizada.

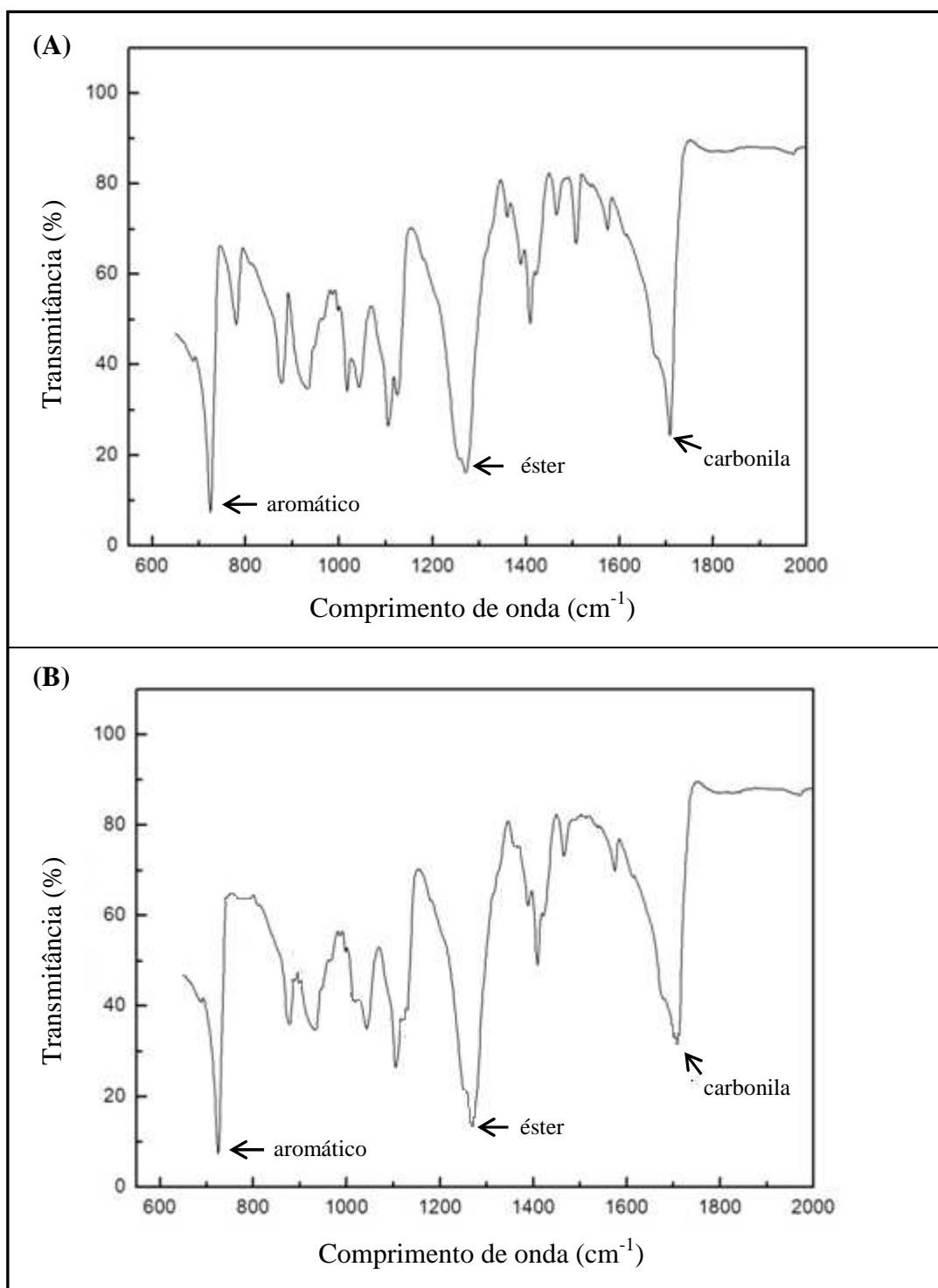
Karayannidis *et al.* (2003) em seu trabalho realizaram a polimerização do PTT adotando as seguintes condições: razão molar de 1:1,2 de ácido tereftálico/1,3-PDO e  $5 \times 10^{-4}$  mol de catalisador para 1 mol de ácido tereftálico adicionado apenas na segunda etapa da síntese. A reação ocorreu a 260°C sob atmosfera de argônio, a pressão atmosférica e agitação constante de 500 rpm. Na esterificação, primeira etapa da reação,

foram recolhidos 8 mL de água. Na segunda etapa da polimerização foi adicionado o catalisador e o vácuo foi mantido a 5 Pa por 30 minutos, a temperatura foi mantida a 260°C e a reação permaneceu por mais 90 minutos.

Neste trabalho as condições adotadas para a realização da polimerização foram satisfatórias para a produção do PTT. Na esterificação, primeira etapa da reação, temperatura inicial de 245 °C e agitação de 90 rpm foram suficientes para que houvesse a homogeneização dos monômeros, ácido tereftálico e 1,3-propanodiol. A atmosfera inerte de nitrogênio, foi importante para que não ocorresse a oxidação do produto formado, e a pressão de 120 mmHg durante toda a reação garantiu a retirada de toda a água formada durante a reação, e o 1,3-propanodiol em excesso, além de garantir que intermediários da reação (oligômeros) não fossem sublimados durante a destilação, que é um dos grandes problemas das reações de policondensação.

#### **4.6.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)**

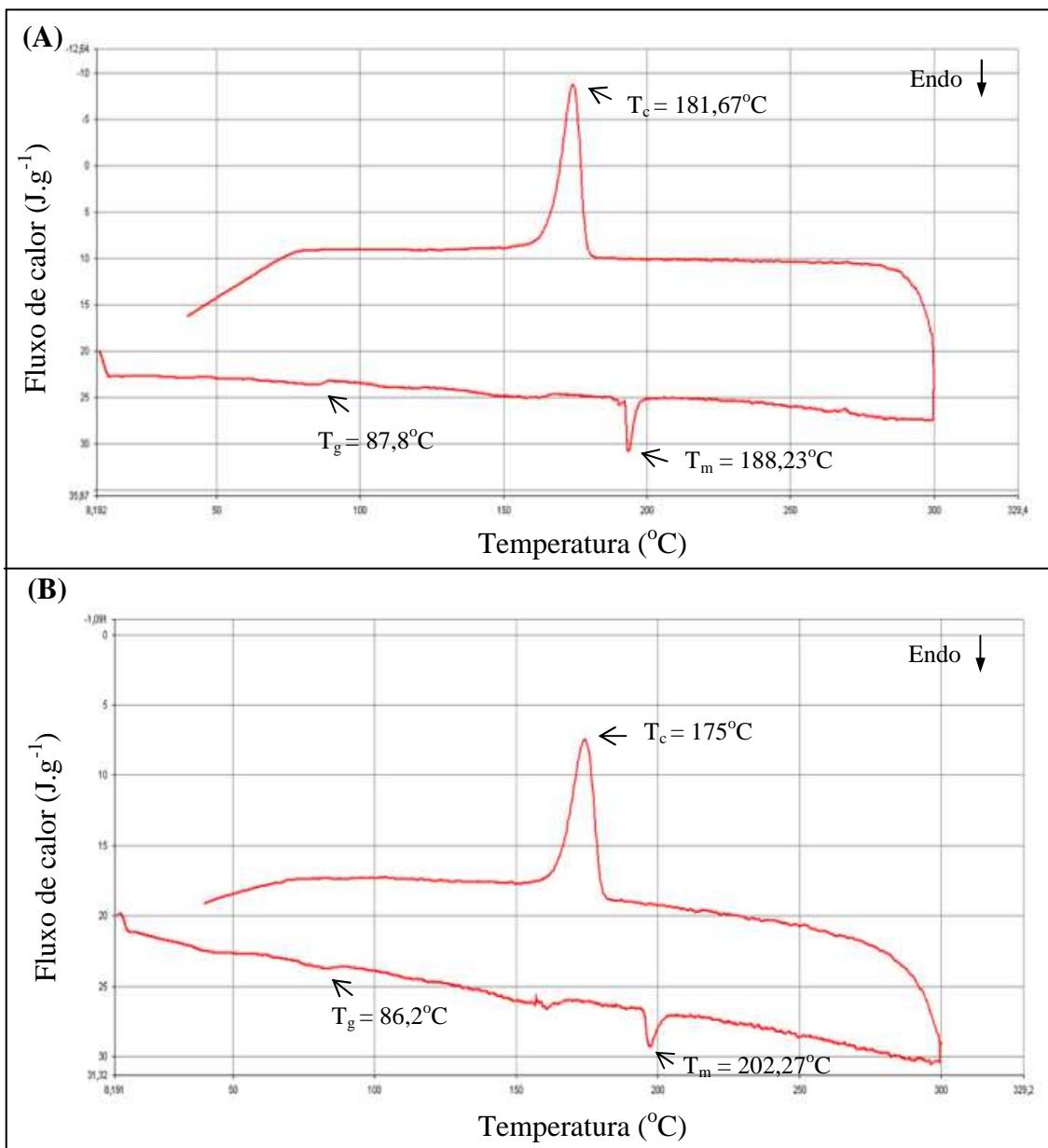
A Figura 31 apresenta os espectros de infravermelho das amostras do PTT sintetizado (bateladas 1 e 2) em que na região a 2911 cm<sup>-1</sup> há uma banda característica da presença de CH<sub>2</sub> na cadeia linear do PTT, a banda em torno de 1088 cm<sup>-1</sup> é atribuída à presença do grupo éster (-O-C=O) e a banda em 1709 cm<sup>-1</sup> é atribuída à presença da carbonila (C=O). Próximo a 1247 cm<sup>-1</sup> aparece uma banda característica do grupamento C-O e observa-se uma banda que caracteriza a presença de anel aromático em 720 cm<sup>-1</sup> (SILVERSTEIN *et al.*, 1994; SKOOG *et al.*, 2002).



**Figura 31** – Espectro no infravermelho do PTT sintetizado, (A) batelada 1 e (B) batelada 2.

#### 4.6.3 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

Os termogramas obtidos por Calorimetria diferencial exploratória (DSC) para as amostras de PTT após a polimerização estão apresentados na Figura 32.



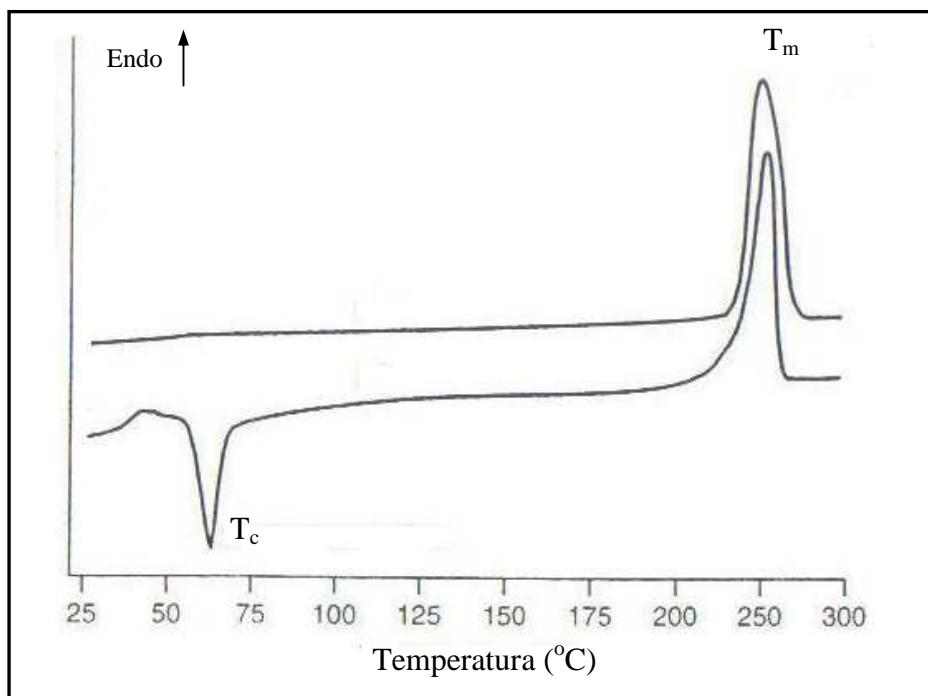
**Figura 32** – Curva DSC das amostras de PTT sintetizados, (A) batelada 1 e (B) batelada 2 (sem nenhum tratamento térmico).

A análise térmica foi empregada para determinar as temperaturas de transição vítreia ( $T_g$ ), cristalização ( $T_c$ ), fusão ( $T_m$ ) e as entalpias de fusão  $\Delta H_m$  e de cristalização

$\Delta H_c$  das amostras de PTT sintetizadas. A identificação das temperaturas e entalpias a partir das curvas DSC das amostras (Figura 32) foi realizada da seguinte forma:

- $T_g$ : pelo desnível na linha de base de aquecimento;
- $T_m$ : pelo pico de fusão cristalina na linha de base de aquecimento;
- $T_c$ : pelo pico de cristalização na linha de base de resfriamento.

As curvas de DSC das amostras de PTT estão apresentadas na Figura 32, com picos endotérmicos em 202,27°C e 188,53°C. O pico endotérmico para o PTT puro em 228°C corresponde a temperatura de fusão do poliéster apresentado na Figura 33 (SCHEIRS e LONG, 2003).



**Figura 33** – Curva DSC das amostras de PTT (taxa de aquecimento, 10°C/min) (Fonte: SCHEIRS e LONG, 2003).

Esta transição ocorre sempre em uma faixa de temperatura, devido a distribuição de tamanho das regiões cristalinas presentes nas macromoléculas. A temperatura na qual desaparece totalmente a cristalinidade é referida como ponto de fusão do polímero e corresponde ao máximo do pico de fusão na curva de DSC (CANEVAROLO JR, 2003).

A temperatura de transição vítreia ( $T_g$ ) é um fenômeno bastante pesquisado e sua determinação tem inúmeras aplicações no estudo e caracterização de amostras poliméricas (CANEVAROLO JR, 2003). Assim, a  $T_g$  permite a identificação de

amostras desconhecidas e os valores do PTT produzido no laboratório são 87,8°C e 86,2°C, respectivamente da primeira e segunda batelada.

Os valores de Tg encontrados para as amostras de PTT sintetizadas não foram confirmados com resultados encontrados na literatura que apresentam a temperatura de transição vítreia num intervalo de 50 a 60°C (CHEN *et al.*, 2007; HSIAO, *et al.*; 2006). Este fato pode ser explicado pela porcentagem cristalina do poliéster, sendo que este durante a síntese houve maior formação de regiões cristalinas na sua estrutura.

A partir das curvas de DSC, o calor de fusão pode ser usado para calcular a fração cristalina do material, visto que um alto valor do calor de fusão indica alta cristalinidade. Sendo assim, o grau de cristalinidade das amostras foi avaliado a partir do pico endotérmico de fusão, empregando a Equação (18) (BANNACH e PERPÉTUO, 2011; CANEVAROLO JR, 2003; DUARTE *et al.*, 2003; HSIAO *et al.*, 2006).

$$\text{cristalinidade}(\%) = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \cdot 100 \quad (18)$$

Onde:  $\Delta H_m$  é a entalpia de fusão da amostra ( $\text{J.g}^{-1}$ );  $\Delta H_m^0$  é a entalpia de fusão do polímero 100% cristalino, a qual, no caso do PTT é igual a 145,6  $\text{J.g}^{-1}$  (CHEN *et al.*, 2007; EBERL *et al.*, 2008).

A Tabela 20 apresenta os resultados de  $T_g$  (temperatura de transição vítreia),  $T_m$  (temperatura de fusão cristalina),  $\Delta H_m$  (entalpia de fusão) e  $X$  (grau de cristalinidade) para as amostras de PTT sintetizadas.

**Tabela 20** – Propriedades térmicas e grau de cristalinidade para o PTT.

Parâmetro	Valor experimental	Valor teórico
$T_g$ (°C)	87,00±1,13	50,00-60,0
$T_m$ (°C)	195,25±9,92	228-248*
$\Delta H_m$ ( $\text{J.g}^{-1}$ )	99,53±1,65	-
$X$ (%)	68,4±1,13	-

Legenda: (\*) PTT semicristalino.

Fonte: SCHEIRS e LONG, 2003.

As amostras de PTT analisadas apresentaram o grau de cristalinidade em torno de 60% indicando que para essas amostras a fração cristalinidade do polímero é maior que a fração amorfa.

As bateladas produzidas e consequentemente os polímeros obtidos apresentaram as mesmas características, confirmando que a metodologia adotada para obtenção do PTT pode ser reproduzida.

## CAPÍTULO 5

### 5. CONCLUSÕES

Este trabalho consistiu em alternativas para produção do 1,3-propanodiol a partir do glicerol. As principais conclusões obtidas foram:

- Uma condição que influenciou bastante na produção do 1,3-PDO foi a concentração inicial de glicerol utilizada. O *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 foi a linhagem que apresentou melhor resultado na fermentação com  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol P.A. obtendo-se  $4,5 \text{ g.L}^{-1}$  de 1,3-propanodiol com rendimento de conversão de glicerol em 1,3-propanodiol igual a 54,4%.
- A linhagem *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 foi selecionada para realizar um estudo dos meios de cultivo de influenciaram na fermentação do glicerol, utilizando a técnica de planejamento experimental Plackett-Burman. Todos os constituintes do meio, glicerol, extrato de levedura,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , PABA e o pH inicial influenciaram na produção do 1,3-PDO. Com base nos melhores resultados para a produção do 1,3-PDO,  $4,97 \text{ g.L}^{-1}$  e  $4,99 \text{ g.L}^{-1}$ , as duas condições de cultivo que originaram nestes resultados, foram utilizadas para a fermentação do glicerol bruto.
- Na fermentação do glicerol bruto com a concentração inicial de  $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ , utilizando *Clostridium butyricum* DSMZ 10702, a agitação não apresentou influenciou na produção do 1,3-PDO que ficou em torno de  $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ . O extrato de levedura apresentou influência na produção do 1,3-propanodiol, com rendimento entre 93 e 94% de conversão do glicerol em 1,3-PDO.
- O modelo de Monod se ajustou bem aos dados experimentais da fermentação do *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259.
- No processo de polimerização do poli(tereftalato de trimetileno) as condições adotadas na policondensação foram satisfatórias levando a produção do poliéster, que pode ser confirmado de acordo com as análises de IV e DSC.

- Na análise de infravermelho foram identificados os picos característicos do éster ( $1088\text{ cm}^{-1}$ ), aromático ( $720\text{ cm}^{-1}$ ) e carbonila ( $1709\text{ cm}^{-1}$ ). Já para a analise de DSC o comportamento térmico obtido para as amostras de PTT apresentou a temperatura de fusão de  $195,25\pm9,92^\circ\text{C}$ . A partir dessa análise foi possível determinar que a cristalinidade do polímero ficou em torno de 60%.

## CAPÍTULO 6

### 6. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Volumes maiores em biorreator;
- Condições operacionais controladas, como temperatura e pH;
- Fermentação contínua, batelada alimentada;
- Trabalhar com concentrações maiores de glicerol na fermentação;
- Utilizar o glicerol bruto do processamento do biodiesel a partir de outras fontes de lipídeos de origem vegetal ou animal;
- Utilizar o 1,3-propanodiol obtido na fermentação na síntese do poli(tereftalato de trimetileno).

## CAPÍTULO 7

### 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAD-ANDALOUSSI, S.; AMINE, J.; GERARD, P.; PETITDEMANGE, H. Effect of glucose on glycerol metabolism by *Clostridium butyricum* DSM 5431. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 515-522, 1998.

AGGELIS, G. **Microbial conversions of raw glycerol**. Nova York: Nova Biomedical Books, 2009.

AHRENS, K.; MENZEL, K.; ZENG, A.; DECKWER, W. Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: enzymes and fluxes of glycerol dissimilation and 1,3-propanediol formation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, p. 544-552, 1998.

AMARAL, P. F. F.; FERREIRA, T. F.; FONTES, G. C.; COELHO, M. A. Z. Glycerol valorization: New biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, p. 179-186, 2009.

ANDERSCH, W.; BAHL, H.; GOTTSCHALK, G. Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 18, P. 327-332, 1983.

ANDRADE, J. C.; VASCONCELOS, I. Continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*: culture stability and low-grade glycerol utilization. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 121-125, 2003.

ARAÚJO, P. W.; BRERETON, R. G. Experimental Design II. Optimization. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 15, n. 2, p. 63-70, 1996.

ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. Glicerol: um subproduto com grande capacidade comercial e metabólica. **Revista Analytica**, Dezembro 2006/Janeiro 2007, n. 26, 2007.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 89-105, 2008.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2a Edição. MacGraw-Hill, Nova York, 1986.

BANNACH, G.; PERPÉTUO, G. L. Efeitos da História Térmica nas Propriedades do Polímero PET: Um Experimento para Ensino de Análise Térmica. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1825-1829, 2011.

BARBIRATO, F.; SOUCAILLE, P.; BORIES, A. Physiologic mechanisms involves in accumulation of 3-hydroxypropionaldehyde during fermentation of glycerol by *Enterobacter agglomerans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4405-4409, 1996a.

BARBIRATO, F.; GRIVET, J. P.; SOUCAILLE, P.; BORIES, A. 3-Hydroxypropionaldehyde, an inhibitory metabolite of glycerol fermentation to 1,3-propanediol by enterobacterial species. **Applied and Environmental Microbiology**, April; v. 62, n. 4, p. 1448-1451, 1996b.

BARBIRATO, F.; BORIES, A. Relationship between the physiology of *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210 grown anaerobically on glycerol and the culture conditions. **Research in Microbiology**, v. 148, p. 475-484, 1997a.

BARBIRATO, F.; SUZETTE, A.; SOUCAILLE, P.; CAMARASA, C.; SALMON, J. M.; BORIES, A. Anaerobic pathways of glycerol dissimilation by *Enterobacter agglomerans* CNCM 1210: limitations and regulations. **Microbiology**, v. 143, p. 2423-2432, 1997b.

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

BARFORD, J. P.; HALL, R. J. An evaluation of the approaches to the mathematical modelling of microbial growth. **Process Biochemistry**, v. 13, p. 22-29, 1978.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BURNS, R. E. **Como Fazer Experimentos – Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Campinas: Editora Unicamp, 2001.

BIEBL, H.; PFENNIG, N. **Isolation of members of the family Rhodospirillaceae**. Berlin: Springer, 1981.

BIEBL, H. Glycerol fermentation of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. Measurement of product inhibition by use a pH-auxostat. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 701-705, 1991.

BIEBL, H.; MARTEN, S.; HIPPE, H.; DECKWER, W. D. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 592-597, 1992.

BIEBL, H.; MARTEN, S. Fermentation glycerol to 1,3-propanediol: use of cosubstrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 15-19, 1995.

BIEBL, H.; MENZEL, K.; ZENG, A. P.; DECKWER, W. D. Microbial production of 1,3-propanediol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 289-297, 1999.

BIEBL, H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* – batch and continuous culture studies. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 18-26, 2001.

BIRK, R.; IKAN, A.; BRAVDO, B.; BRAUN, S.; SHOSEYOV, O. Synthesis of isopropyl-1-thio-(D-glucopyranoside) (IPTGLc), an inducer of *Aspergillus niger* B1

glucosidase production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 66, p. 25-30, 1997.

BORZANI, W.; AQUARONE, E.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia Industrial**. Volumes 2 e 4. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda., 2001.

BOWLES, L. K.; ELLEFSON, W. L. Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1165-70, 1985.

BOX, G. E. P.; HOLOHAN, R.; SCOTT, E. **Statistic for experiments**. New York: John Wiley & Sons, 1978.

CALLEGARE, A. J. A. **Introdução ao Delineamento de Experimentos**. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001.

CAMERON, D. C.; ALTARAS, N. E.; HOFFMAN, M. L.; STRAW, A. J. Metabolic engineering of propanediol pathways. **Biotechnology Progress**, v. 14, p. 116-125, 1998.

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

CÁRDENAS, D. P.; PULIDO, C.; ARAGÓN, O. L.; ARISTIZÁBAL, F. A.; SUÁREZ, Z. R. MONTOYA, D. Evaluación de la producción de 1,3-propanodiol por cepas nativas de *Clostridium sp*. Mediante fermentación a partir de glicerol USP y glicerol industrial subproducto de la producción de biodiesel. **Revista Colombiana Ciências Químicas e Farmaceuticas**, v. 35, n. 1, p. 120-137, 2006.

CATO, E.P.; GEORGE, W.L.; FINEGOLD, S.M. Genus Clostridium. In: SNEATH, P. H.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore, MD: Williams and Wilkins, v.2, p. 1141-1200, 1986.

ÇELİK, E.; OZBAY, N.; OKTAR, N.; ÇALIK, P. Use of biodiesel byproduct crude glycerol as the carbon source for fermentation processes by recombinant *Pichia pastoris*. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 47, p. 2985-2990, 2008.

CELIŃSKA, E. Debottlenecking the 1,3-propanediol pathway by metabolic engineering. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 519-530, 2010.

CHATZIFRAGKOU, A.; PAPANIKOLAU, S.; DIETZ, D.; DOULGERAKI, A. L., NYCHAS, G. J. E.; ZENG, A. P. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. **Applied of Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 101-112, 2011.

CHEN, X.; HOU, G.; CHEN, Y.; YANG, K.; DONG, Y.; ZHOU, H. Effect of molecular weight on crystallization, melting behavior and morphology of poly(trimethylene terephalate). **Polymer Testing**, v. 26, p. 144-153, 2007.

CHENG, K. K.; ZHANG, J. A.; LIU, D. H.; SUN, Y.; LIU, H. J.; YANG, M. D.; XU, J. M. Pilot-scale production of 1,3-propanediol using *Klebsiella pneumoniae*. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 740-744, 2007.

COLIN, T.; BORIES, A.; MOULIN, G. Inhibition of *Clostridium butyricum* by 1,3-propanediol and diols during glycerol fermentation. **Applied of Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 201-205, 2000.

CUMMINS, C.; JOHNSON, J. Taxonomy of the Clostridia: Wall composition and DNA homologies in *Clostridium butyricum* and other butyric acid-producing Clostridia. **Journal of General Microbiology**, v. 67, p. 33-46, 1971.

DABROCK, B.; BAHL, H.; GOTTSCHALK, G. Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 1233-1239, 1992.

DANIEL, R.; STUERTZ, K.; GOTTSCHALK, G. Biochemical and molecular characterization of the oxidative branch of glycerol utilization by *Citrobacter freundii*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 4392-4401, 1995a.

DANIEL, R; SEYFRIED, M; GOTTSCHALK, G. Cloning, sequencing and overexpression of the genes encoding coenzyme B<sub>12</sub>-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*. **BioFactors**, v. 5, p .207, 1995b.

DAWSON, M. S.; HARFORD, A. M.; GARNER, B. K.; SICA, D. A.; LANDWEHR, D. M.; DALTON, H. P. Total volume culture technique for the isolation of microorganism form continuous ambulatory peritoneal dialysis patients with peritonitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 2, p. 391-394, 1985.

DECKWER, W. D. Microbial conversion of glicerol to 1,3-propanediol. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, p. 143-149, 1995.

DROŻDŻYŃSKA, A.; LEJA, K.; CZACZYK, K. Biotechnological production of 1,3-propanediol from crude glycerol. **Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology**, v. 92, n. 1, p. 92-100, 2011.

DUARTE, L. T.; LINS, V. F.; MARIANO, C.; BRANCO, J. R.; COLLARES, M. P.; GALERY, R. Recobrimentos de poli(Tereftalato de Etileno) depositados em aço por aspersão térmica a partir de pós obtidos em diferentes condições de moagem. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 3, p. 198-204, 2003.

**DuPont Tate & Lyle BioProducts.** Disponível em <<http://www.duponttateandlyle.com>>. Acesso em: 20 agosto de 2012.

**DuPont™** **Sorona®.** Disponível em <[http://www2.dupont.com/Sorona\\_Consumer/en\\_US/About\\_Sorona/About\\_Sorona.htm](http://www2.dupont.com/Sorona_Consumer/en_US/About_Sorona/About_Sorona.htm)>. Acesso em agosto de 2012.

EBERL, A.; HEUMANN, S.; KOTEK, R.; KAUFMANN, F.; MITSCHE, S. PAULO, A. C. Enzymatic hydrolysis of PTT polymers and oligomers. **Journal of Biotechnology**, v. 135, p. 45-51, 2008.

FERREIRA, E. M. F. C. **Identificação e controle adaptativo de processos biotecnológicos**. Tese de Doutorado. Porto, Portugal: Universidade do Porto, 1995.

FERREIRA, F. G. D.; ALMEIDA, Y. M. B.; VINHAS, G. M.; LIMA, M. A. G. A. PEREIRA, R. F. C. Conversão microbiológica do glicerol a 1,3-propanodiol pelo *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. In: XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2010, Foz do Iguaçu, PR, **Anais...** Foz do Iguaçu, PR: ABEQ, 2010a. CD ROM.

FERREIRA, F. G. D.; VINHAS, G. M.; LIMA, M. A. G. A.; ALMEIDA, Y. M. B. BEZERRA, V. C. R.; MORAES, C. M. Avaliação da pré-cultura na produção do 1,3-propanodiol pelo *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 a partir da fermentação do glicerol. In: 50º Congresso Brasileiro de Química, 2010, Cuiabá, MS. **Resumo expandido**. Cuiabá, MS: 2010b.

FERREIRA, F. G. D.; VINHAS, G. M.; ALMEIDA, Y. M. B.; LIMA, M. A. G. A. Study of viability of 1,3-propanediol production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259. **Canadian Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 6, p. 2057-2062, 2012.

FORESTI, E.; FLORÊNCIO, L.; VAN HAANDEL, A.; ZAIAT, M.; CAVALCANTI, P. F. F. Fundamentos do Tratamento Anaeróbio. In: CAMPOS, J. R. (Coord.). Tratamento de Esgotos Sanitários por Processo Anaeróbio e Disposição Controlada no Solo. Rio de Janeiro: ABES, p. 29-52, 1999.

FORSBERG, C. W. Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 639-643, 1987.

GANDINI, A.; COELHO, D.; GOMES, M. Materials from renewable resources based on furan monomers and furan chemistry: Work in progress. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, p. 8656-8664, 2009.

GIRBAL, L.; SOUCAILLE, P. Regulation of *Clostridium acetobutylicum* metabolism as revealed by mixed substrate steady-state continuous culture: role of NADH/NAD ratio and ATP pool. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 6433-6438, 1994.

GIRBAL, L.; CROUX, C.; VASCONCELOS, I.; SOUCAILLE, P. Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 17, p. 287-297, 1995a.

GIRBAL, L.; VASCONCELOS, I.; SAINT-AMANS, S.; SOUCAILLE, P. How neutral red modified carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2-3, p. 151-162, 1995b.

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; ANDRADE, J. C.; VASCONCELOS, I. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 using synthetic medium and raw glycerol. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 442-446, 2004.

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; MEYNIAL-SALLES, I.; MENDES, F.; ANDRADE, J. C.; VASCONCELOS, I.; SOUCAILLE, P. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. **Metabolic Engineering**, v. 7, p. 329-336, 2005a.

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; ANDRADE, J. C.; VASCONCELOS, I. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in continuous cultures with high yield and productivity. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 391-396, 2005b.

GONZÁLEZ-PAJUELO, M.; MEYNIAL-SALLES, I.; MENDES, F.; SOUCAILLE, P.; VASCONCELOS, I. Microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol:

physiological comparison of a natural producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266 and an engineered strain, *Clostridium acetobutylicum* DGI(pSPD5). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 96-101, 2006.

GOTTO, E. C.; BARBOSA, P. E.; KISTNER, C. L. L.; MOREIRA, G. F.; LENARTOVICZ, V.; PERALTA, M. R. Production of amylase by *Aspergillus fumigatus* utilizing methyl-D-glycoside, a synthetic analogue of maltose, as substrate. **FEMS Microbiology Letters**, v. 167, p. 139-141, 1998.

GREASHAM, R. L. **Media for microbial fermentations**. In: REED REHM J. RG. Biotechnology Second, Completely Revised Edition VCH Bioprocessing, v. 3, p. 128-156, 1993.

GUNGORMUSLER, M.; GONEN, C.; OZDEMIR, G.; AZBAR, N. 1,3-propanediol production potential of *Clostridium saccharobutylicum* NRRL B-643. **New Biotechnology**, v. 27, p. 782-788, 2010.

GUNZEL, B.; YONSEL, S.; DECKWER, W. D. Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2 m<sup>3</sup>. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 289-294, 1991.

HAASA, T.; JAEGERA, B.; WEBERA, R.; MITCHELLB, S. F.; KINGB, C. F. New diol processes: 1,3-propanediol and 1,4-butanediol. **Applied Catalysis A: General**, v. 280, p. 83-88, 2005.

HAYASHI, S.; HINOTANI, T.; HAYASHI, T.; TAKASAKI, Y.; IMADA, K. Development of medium componentes for the production of glucosyl-transferring enzyme by *Aureobasidium*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 248-250, 1993.

HEYNDRICKX, M.; DEVOS, P.; VANCANNEYT, M.; DE LEY, J. The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212 t2 and 1213 t1 and *Clostridium pasteurianum* LMG 3285. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 637-642, 1991.

HIMMI, E. L.; BORIES, A.; BARBIRATO, F. Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *Bioresource Technology* 67: 123-128, 1999.

HSIAO, K. J.; LEE, S. P.; KONG, D. C.; CHEN, F. L. Thermal and mechanical properties of poly(trimethylene terephthalate) (PTT)/cationic dyeable poly(trimethylene terephthalate) (CD-PTT) polyblended fibers. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 102, p. 1008-1013, 2006.

HUANG, H.; GONG, C. S.; TSAO, G. T. Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98, p. 687-698, 2002.

**ICIS Green Chemicals** (2010). Disponível em <<http://www.icis.com/blogs/green-chemicals/2010/05/dupont-tate-lyle-expands-bio-p.html>>. Acesso em: 20 de agosto de 2012.

IGARI S.; MORI S.; TAKIKAWA, Y. Effects of molecular structure of aliphatic diols and polyalkylene glycol as lubricants on the wear of aluminum. *Wear*, v. 244, p. 180-184, 2000.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 100, p. 260-265, 2005.

JAIN, M. K.; GLEESON, J.; UPRETI, G. G. Intrinsic perturbing ability of alkanols in lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 509: 1-8, 1978.

JONES, D. T.; WOODS, D. R. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews*, v. 50, p. 484-524, 1986.

KARAYANNIDIS, G. P.; POUPAKIAS, C. P.; BIKIARIS, D. N.; ACHILIAS, D. S. Study of various catalysts in the synthesis of poly(propylene terephthalate) and mathematical modeling of the esterification reaction. *Polymer*, v. 44, p. 931-942, 2003.

KAUR, G.; SRIVASTAVA, A. K.; CHAND, S. Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 106-118, 2012.

HAYASHI, S.; HINOTANI, T.; TAKASAKI, Y.; IMADA, K. Development of medium componentes for the production of glucosyl-transferring enzyme by *Aureoteobasidium*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p. 248-250, 1993.

KUBIAK, P.; LEJA, K.; MYSZKA, K.; CELINKA, E.; SPYCHALA, M.; SZYMANOWSKA-POWALOWSKA, D.; CZACZYK, K.; GRAJEK, W. Physiological predisposition of various *Clostridium* species to synthetize 1,3-propanediol from glycerol. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1308-1319, 2012.

KUNDU, A. K.; DAS, S. Production of amylase in liquid culture by a strain of *Aspergillus oryzae*. **Applied Microbiology**, v. 19, p. 598-603, 1970.

LACERDA, C. E. O.; FERREIRA, F. G. D.; ALMEIDA, Y. M. B.; LIMA, LIMA, M. A. G. A.; VINHAS, G. M. Fermentação do glicerol pelo *Clostridium butyricum* DMSZ 10702 para produção de 1,3-propanodiol. In: XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Búzios, RJ, **Anais...** Búzios, RJ: COBEQ, 2012. CR ROM.

LEE, P. C.; LEE, W. G.; LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Effects of medium components on the growth of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* and succinic acid production. **Process Biochemistry**, v. 35; p. 49-55, 1999.

LIN, E. C.; MAGASANIK, B. The activation of glycerol dehydrogenase from *Aerobacter aerogenes* by monovalent cations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 235, p. 1820-1823, 1960.

LIN, R.; LIU, H.; HAO, J.; CHENG, K.; LIU, D. Enhancement of 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* with fumarate addition. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 1755-1759, 2005.

LINDEN, J. C.; MOREIRA, A. **Anaerobic production of chemicals**. New York: Plenum Press, 1982.

LUERS, F.; SEYFRIED, M.; DANIEL, R.; GOTTSCHALK, G. Glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium pasteurianum*: cloning and expression of the gene encoding 1,3-propanediol dehydrogenase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 154, p. 337-345, 1997.

LUONG, J. H. T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, n. 3, p. 280-285, 1985.

MACIS, L.; DANIEL, R.; GOTTSCHALK, G. Properties and sequence of the coenzyme B<sub>12</sub>-dependent glycerol dehydratase of *Clostridium pasteurianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 164, p. 21-28, 1998.

MAERVOET, V. E. T.; MEY, M. D.; BEAUPREZ, J.; MAESENEIRE, S. D.; SOETAERT, W. K. Enhancing the microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol using metabolic engineering. **Organic Process Research & Development**, v. 15, p. 189-202, 2011.

MASROOR, K. M.; CHANDRA, S. Role of inorganic sources on antibiotic production by *Aspergillus sp.* Antagonistic to citrus canker pathogen. **National academy Science Letters**, v. 12, p. 43-45, 1989.

MATTA-EL-AMMOURI, G.; JANATI-IDRISSI, R.; JUNELLES, A. M.; PETITDEMANGE, H.; GAY, R. Effects of butyric and acetic acids on acetone-butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*. **Biochimie**, v. 69, n. 2, p. 109-15, 1987.

MOLONGOSKI, J. J.; KLUG, M. J. Characterization of anaerobic heterotrophic bactéria isolated from freshwater lake sediments. **Applied Environmental Microbiology**, v. 31, p. 83-90, 1976.

MOON, C.; LEE, C. H.; SANG, B. I. UM, Y. Optimization of medium compositions favoring butanol and 1,3-propanediol production from glycerol by *Clostridium pasteurianum*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10561-10568, 2011.

MORAES, Cristiane. M. **Utilização da Glicerina na Produção Fermentativa do 1,3-Propanodiol pelo *Clostridium acetobutylicum***. Dissertação de Mestrado. Recife, PE: UFPE, 2011.

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

MU, Y.; TENG, H.; ZHANG, D. J.; WANG, W.; XIU, Z. L. Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 1755-1759, 2006.

MUCCILLO, Daniela. **Estudos *in silico* para a produção bacteriana de hidrogênio**. Dissertação de Mestrado. Florianópolis, SC: UFSC, 2007.

NAKAMURA, C. E.; GATENBY, A. A.; HSU, A. K. H.; REAU, R. D. L.; HAYNIE, S. L.; DIAZ-TORRES, M.; TRIMBUR, D. E.; WHITED, G. M.; NAGARAJAN, V.; PAYNE, M. S.; PICATAGGIO, S. K.; NAIR, R. V. (United States of America) **Method for the production of 1,3-propanediol of recombinant microorganism**. US n. PI 6013494, 11 jan. 2000.

NAKAMURA, C. E.; WHITED, G. M. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 454-459, 2003.

NAKAS, J. P.; SCHÄDLE, M.; PARKINSON, C. M.; COONLEY, C. E.; TANENBAUM, S. W. System-development for linked-fermentation production of solvents from algal biomass. **Applied Environmental Microbiology**, v. 46, p. 1017-1023, 1983.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS. R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401, 2006.

NETO, W. S. **Cinética de processos fermentativos**. In: *Curso fermentation technology*. Florianópolis, 1999.

NIST / SEMATECH. **Engineering Statistics Handbook**. Disponível em: < <http://w.itl.nist.gov/div898/handbook/index.htm> > Acesso em: 20 de agosto de 2011.

O'BRIEN, J.; RAYNAUD, C.; CROUX, C.; GIRBAL, L.; SOUCAILLE, P.; LANZILOTTA, W. Insight into the mechanism of the B<sub>12</sub>-independent glycerol dehydratase from *Clostridium butyricum*: Preliminary biochemical and structural characterization. **American Chemical Society**, v. 43, n. 16, p. 4635-4645, 2004.

OTTE, B.; GRUNWALDT, E.; MAHMOUND, O.; JENNEWEIN, S. Genome shuffling: progress and application for phenotype improvement. **Biotechnology Advances**, v. 75, n. 24, p. 7610-7616, 2009.

PAGLIARO, M.; CIRIMINNA, R.; KIMURA, H.; ROSSI, M.; PINA, C. D. From glycerol to value-added products. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, p. 4434-4440, 2007.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; ASHAKUMARY, L. Glucoamylase production by *Aspergillus niger* on rice bran is improved by adding nitrogen sources. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 10, p. 348-349, 1994.

PANG, K.; KOTEK, R.; TONELLI, A. Review of conventional and novel polymerization processes for polyesters. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 1009-1037, 2006.

PAPANIKOLAOU, S.; RUIZ-SANCHES, P.; PARISSET, B.; BLANCHARD, F.; FICK, M. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. **Journal of Biotechnology**, v. 77, p. 191-208, 2000.

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; MARC, I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. **Applied Microbiology**, v. 92, p. 737-744, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Modelling aspects of the biotechnological valorization of raw glycerol: production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* and 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. **Journal Chemical Technological Biotechnology**, v. 78, p. 542-547, 2003.

PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 60-71, 2008.

PAPANIKOLAOU, S. **Microbial conversion of glycerol into 1,3-propanediol: glycerol assimilation, biochemical events related with 1,3-propanediol biosynthesis and biochemical engineering of the process**. New York: Nova Science Publishers Inc., 2009.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 106-110, 2005.

PEREIRA JR, N.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Séries em Biotecnologia. Tecnologia de Bioprocessos**. Volume 1. Escola de Química (UFRJ). Rio de Janeiro, 2008.

PETITDEMAGE, E.; DURR, C.; ANDALOUSSI, S. A., RAVAL, G. Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol by new strains of *Clostridium butyricum*. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 5, p. 498-502, 1995.

PINTO, M. M. L. **Obtención bioquímica de 1,3-propanodiol a partir de glicerina**. Dissertação de Mestrado. Valladolid, Espanha: Universidade de Valladolid, 2009.

PIRT, S. J. **Principles of microbe and cell cultivation.** Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1975.

Press                  Release                  (2007).                  Disponível                  em:  
[<http://www2.dupont.com/Media\\_Center/pt\\_BR/news\\_releases/2007/bio\\_pdo.html>](http://www2.dupont.com/Media_Center/pt_BR/news_releases/2007/bio_pdo.html).  
Acesso em: 21 agosto de 2012.

RAMACHANDRAN, N.; SREEKANTIAH, K. R.; MURTHY, V. S. Influence of media composition on the production of amylase and amyloglucosidase by a strain of *Aspergillus niger*. **Staerke**, v. 31, p. 134-138, 1979.

RAYNAUD, C.; SARÇABAL, P.; MEYNIAL-SALLES, I.; CROUX, C.; SOUCAILLE, P. Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 5010-5015, 2003.

REHMAN, A. U.; MATSUMURA, M.; NOMURA, N.; SATOS, S. Growth and 1,3-propanediol production on pre-treated sunflower oil biodiesel raw glycerol using a strict anaerobe *Clostridium butyricum*. **Current Research in Bacteriology**, v. 1, p. 7-16, 2008.

REIMANN, A.; BIEBL, H.; DECKWER, W. D. Influence of iron, phosphate and methyl viologen on glycerol fermentation of *Clostridium butyricum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, p. 47-50, 1996.

REIMANN, A.; ABBAD-ANDALOUSSI, S.; BIEBL, H.; PETTIDEMANGE, H. 1,3-propanediol formation with production-tolerant mutants of *Clostridium butyricum* DSM 5431 in continuous culture: productivity, carbon and electron flow. **Journal Applied Microbiology**, v. 84, p. 1125-1130, 1998a.

REIMANN, A.; BIEBL, H.; DECKWER, W. D. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* in continuous culture with cell recycling. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p. 359-363, 1998b.

RINGEL, A. K.; WILKENS, E.; HORTIG, D.; WILKE, T.; VORLOP, K. D. An improved screening method for microorganisms able to convert crude glycerol to 1,3-propanediol and to tolerate high product concentrations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1049-1056, 2012.

RIVALDI, J. D.; SARROUH, B. F.; FIORILLO, R.; SILVA, S. S. Glicerol de biodiesel. Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 37, p. 44-51, 2007.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2<sup>a</sup> edição. Campinas, SP: Editora Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

RUCH, F. E.; LIN, E. C. C. Independent constitutive expression of the aerobic and anaerobic pathways of glycerol catabolism in *Klebsiella aerogenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 124, p. 348-352, 1975.

SAINT-AMANS, S.; PERLOT, P.; GOMA, G.; SOUCAILLE, P. High production of 1,3-production from glycerol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in a simply controlled fed-batch system. **Biotechnology Letters**, v. 16, p. 831-836, 1994.

SAINT-AMANS, S.; GIRBAL, L.; ANDRADE, J.; AHRENS, K.; SOUCAILLE, P. Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 grown on glucose-glycerol mixtures. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 1748-1754, 2001.

SANFORD, K.; VALLE, F.; GHIRNIKAR, R. Pathway engineering through rational design. **Genetic Engineering News**, v. 24, n. 2, p. 44-45, 2004.

SAXENA, R. K.; ANAND, P.; SARAN, S.; ISAR, J. Microbial production of 1,3-propanediol: recent developments and emerging opportunities. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 895-913, 2009.

SCHEIRS, J.; LONG, T. E. **Modern Polyesters: Chemistry and Technology of Polyesters and Copolyesters**. New York: John Wiley and Sons, 2003.

SCHUTZ, H.; RADLER, F. Anaerobic reduction of glycerol to 1,3-propanediol by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 5, p. 169-178, 1984.

SEIFERT, C.; BOWIEN, S.; GOTTSCHALK, G.; DANIEL, R. Identification and expression of the genes and purification and characterization of the genes products involved in reactivation of coenzyme B<sub>12</sub>-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 2369-2378, 2001.

SEYFRIED, M.; DANIEL, R.; GOTTSCHALK, G. Cloning, sequencing and overexpression of the genes encoding coenzyme B<sub>12</sub>-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 5793-5796, 1996.

SHIMIZU, T.; KATSURA, T. Steady-state kinetic study on the inhibition of the adenosinetriphosphatase activity of dynein from *Tetrahymena cilia* by glycerol. **Journal of Biochemistry**, v. 103, p. 99-105, 1988.

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

SILVA, G. P. **Bioconversão do glicerol em 1,3-propanodiol pela bactéria Klebsiella pneumoniae GLC29**. Tese de Doutorado. Rio Claro, São Paulo: Universidade Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2010.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. São Paulo: Editora Bookman, 2002.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 5º Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1994.

SINKAIR, V. P.; LEWIS, F. N. Increased glucoamylase production using agricultural by products. **Journal of Food Biochemistry**, v. 4, p. 159-168, 1980.

SOBOLOV, M.; SMILEY, K. L. Metabolism of glycerol by an acrolein-forming *Lactobacillus*. **Journal Bacteriology**, v. 79, p. 261-266, 1960.

**SRI Consulting.** 1,3-propanediol and polytrimethylene terephthalate. PEP'97 227 ERM & RGB, 2000.

SRIMOON, P.; DANNGSEEVUN, N.; SUPAPHOL, P.; STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of Fermentation Technology**. Second Edition. Butterworth Heinemann, Elsevier Science, 1995.

STRAYER, L. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1996.

STREEKSTRA, H.; TEIXEIRA DE MATTOS, M. J.; NEIJSEL, O. M.; TEMPEST, D. W. Overflow metabolism during anaerobic growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 on glycerol and dihydroxyacetone in chemostat culture. **Archives of Microbiology**, v. 147, p. 268-275, 1987.

STREMEL, D. P. **Desenvolvimento de modelos estruturados alternativos para o processo de produção de etanol**. Tese de Doutorado. Campinas-SP, Brasil. Universidade Estadual de Campinas, 2001.

TACONI, K. A.; VENKATARAMANAN, K. P.; JOHNSON, D. T. Growth and solvent production by *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013 utilizing biodiesel-derived crude glycerol as the sole carbon source. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 28, p. 100-110, 2009.

TERRACCIANO, J. S.; KASHKET, E. R. Intracellular conditions required for initiation of solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 86-91, 1986.

TONG, C. H.; BAJENDRA, K. Effect of carbon and nitrogen sources on the growth and production of cellulose enzymes of a newly isolated *Aspergillus sp*. **Pertanika**, v. 15, p. 45-50, 1992.

TORAYA, T.; HONDA, S.; KUNO, S.; FUKUI, S. Coenzyme B<sub>12</sub>-dependent diol dehydratase: regulation of apoenzyme synthesis in *Klebsiella pneumoniae* (*Aerobacter aerogenes*) ATCC 8724. **Journal of Bacteriology**, v. 135, p. 726-729, 1978.

TORAYA, T.; HONDA, S.; KUNO, S.; FUKUI, S. Distribution of coenzyme B<sub>12</sub>-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase in selected genera of Enterobacteriaceae and Propionibacteriaceae. **Journal of Bacteriology**, v. 141, p. 1439-1442, 1980.

VASCONCELOS, I.; GIRBAL, L.; SOUCAILLE, P. Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 5, p. 1443-50, 1994.

WEIZMANN, C.; ROSENFELD, B. The activation of the butanol-acetone fermentation of carbohydrates by *Clostridium acetobutylicum* (Weizmann). **Biochemical Journal**, v. 319, n. 4, p. 619-39, 1937.

WILKENS, E.; RINGEL, A.; HORTIG, D.; WILKE, T.; VORLOP, K. D. High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR 102a. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1057-1063, 2012.

YANG, G.; TIAN, J.; LI, J. Fermentation of 1,3-propanediol by a lactate deficient mutant of *Klebsiella oxytoca* under microaerobic conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 5, p. 1017-1024, 2006.

XU, Y. Z.; GUO, N. N.; ZHENG, Z. M.; OU, X. J.; LIU, H. J.; LIU, D. H. Metabolism in 1,3-propanediol fed-batch fermentation by a D-lactate deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, p. 965-972, 2009.

ZAIAT, M.; FORESTI, E. Method for estimating the kinetic of substrate degradation in horizontal - flow anaerobic immobilized sludge reactor. **Biotechnology Techniques**, v. 11, p. 315-318, 1997.

ZENG, A. P.; ROSS, A.; BIEBL, H.; TAG, C.; GUNZEL, B.; DECKWER, W. D. Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 902-911, 1994.

ZENG, A. P. Pathway and kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. **Bioprocess Engineering**, v. 14, p. 169-175, 1996.

ZENG, A. P.; BIEBL, H. Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 74, p. 239-259, 2002.

ZHANG, G. L.; MAA, B. B.; XUA, X. L.; CHUN, L.; WANG, L. Fast conversion of glycerol to 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, p. 256-260, 2007.

ZHANG, C. H.; MA, Y. J.; YANG, F. X.; LIU, W.; ZHANG, Y. D. Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using glycerol from biodiesel preparations. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 134-139, 2009.

ZHEREBTSOV, N. A.; NASONOVA, L. V. Influence of carbon and nitrogen sources on biosynthesis of proteinases with keratin-digesting activity. **Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya**, v. 25, p. 508-512, 1989.

<[http://www2.dupont.com/Open\\_Science\\_USA/en\\_US/us\\_rene/usrene\\_articles/re\\_us01\\_convertingsugar.html](http://www2.dupont.com/Open_Science_USA/en_US/us_rene/usrene_articles/re_us01_convertingsugar.html)>. Acesso em: 20 de agosto de 2012.

<<http://www.duponttateandlyle.com/productssusterra.html>>. Acesso em: 20 de agosto de 2012.

<[http://www.miyarisan.com/english\\_index.htm](http://www.miyarisan.com/english_index.htm)>. Acesso em: 20 de novembro 2012.

<<http://www.napier.ac.uk/randkt/rktcentres/bfrc/Pages/ABEhistory.aspx>>. Acesso em: 20 de novembro de 2012.

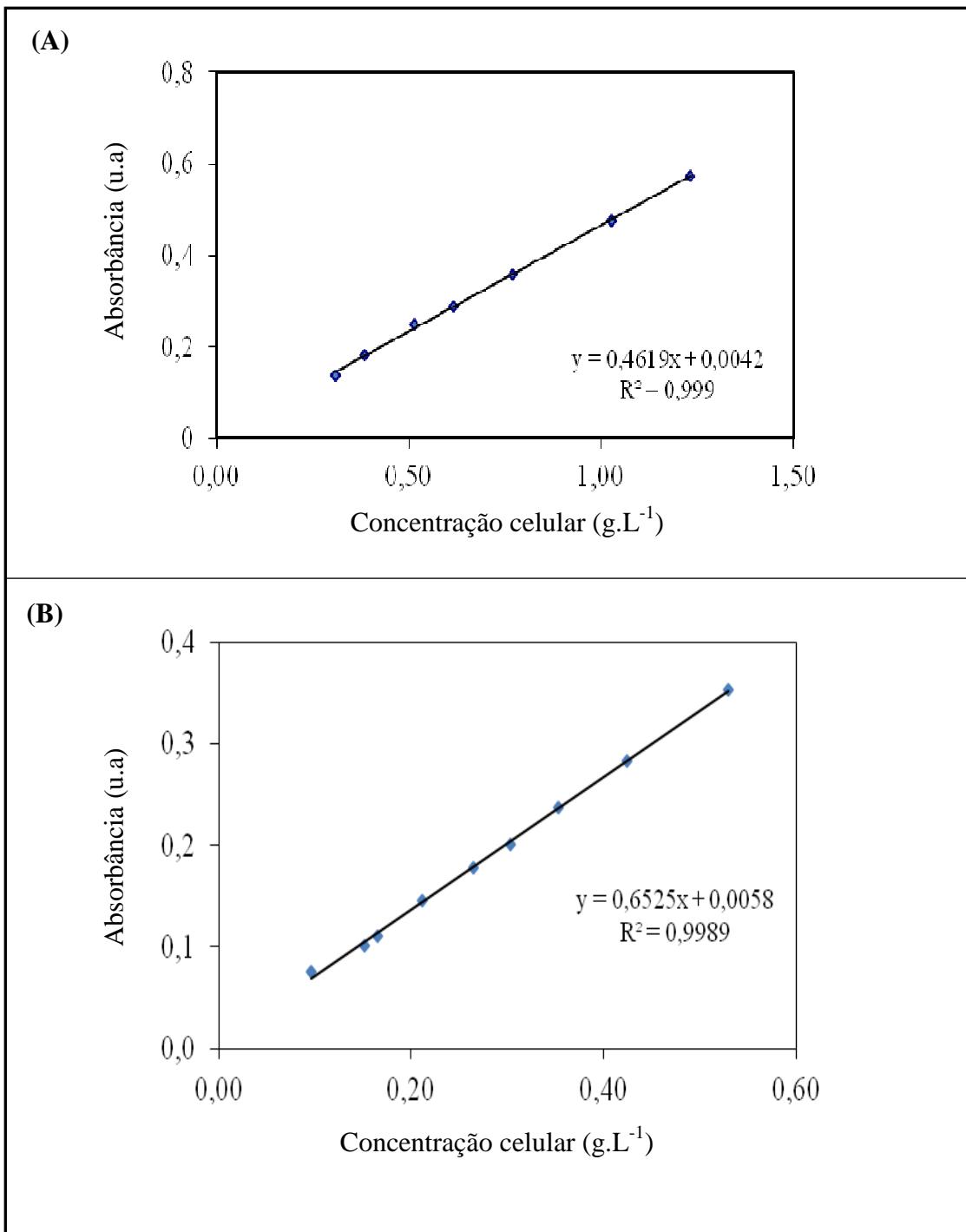
<<http://www.newswire.ca/en/releases/archive/March2009/03/c5216.html>>. Acesso em: 20 de agosto de 2012.

<<http://www.newswire.ca/en/releases/archive/December2009/09/c9468.html>>. Acesso em: 20 de agosto de 2012.

## APÊNDICE

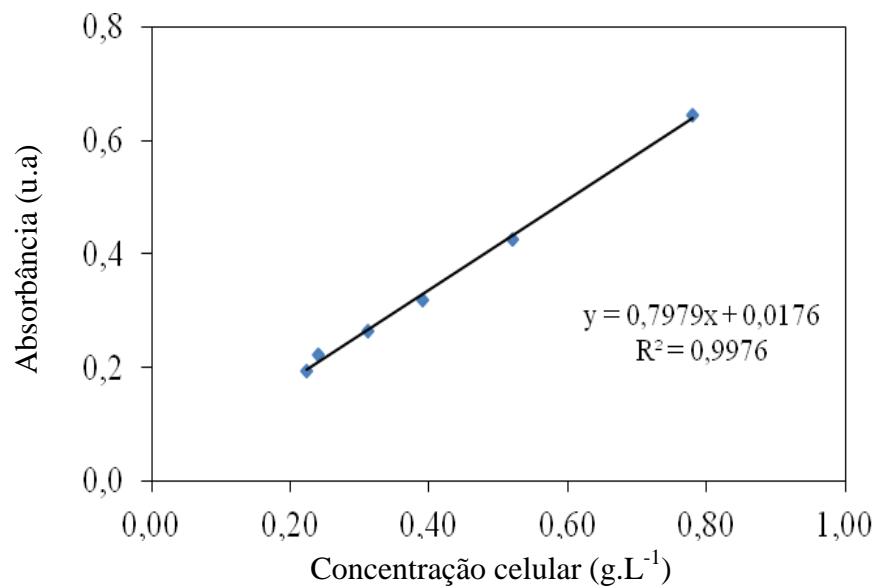
## APÊNDICE A

### 1. CURVAS DE CALIBRAÇÃO

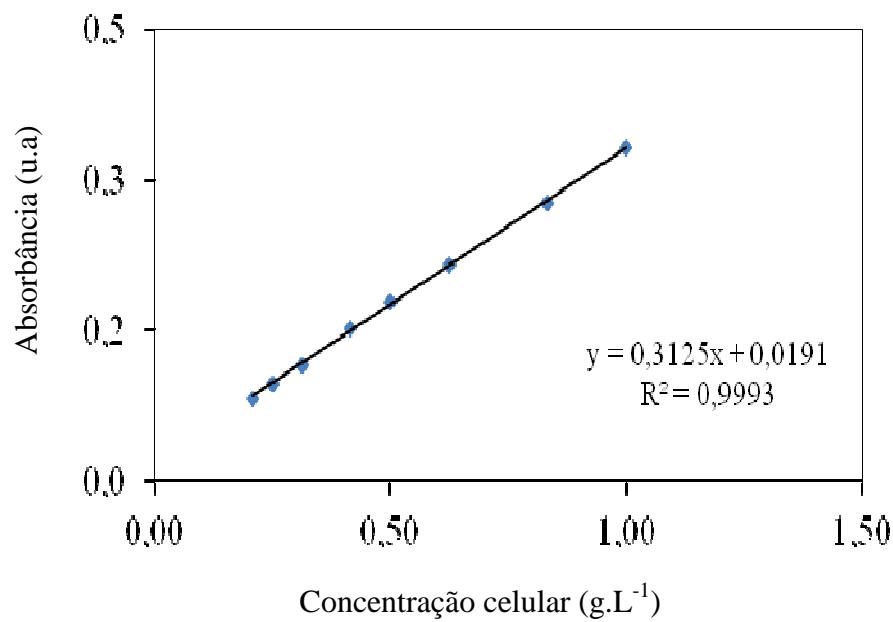


**Figura 34** – Curvas de calibração dos micro-organismos (A) *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259, (B) *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, (C) *Clostridium acetobutylicum* ATCC 10132 e (D) *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 (continua).

(C)



(D)



**Figura 34 – Continuação.**

## ANEXO

### 1. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

#### 1.1 Artigo publicado

FERREIRA, F. G. D.; LIMA, M. A. G. A.; VINHAS, G. M.; ALMEIDA, Y. M. B. Study of viability of 1,3-propanediol production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259. **Canadian Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 6, n. 3, p. 2057-2062, 2012.

#### 1.2 Trabalhos publicados em Congressos Nacionais

LACERDA, C. E. O.; FERREIRA, F. G. D.; ALMEIDA, Y. M. B.; LIMA, LIMA, M. A. G. A.; VINHAS, G. M. Fermentação do glicerol pelo *Clostridium butyricum* DMSZ 10702 para produção de 1,3-propanodiol. In: XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Búzios, RJ, **Anais...** Búzios, RJ: COBEQ, 2012. CD ROM.

FERREIRA, F. G. D.; SANTOS, A. M. P.; LIMA, M. A. G. A.; VINHAS, G. M.; ALMEIDA, Y. M. B. Avaliação da produção de 1,3-propanodiol por bactérias do gênero *Clostridium*. Sinaferm 2011 – XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011, Caxias do Sul - RS.

FERREIRA, F. G. D.; SILVA NETO, P. C.; ALMEIDA, Y. M. B.; VINHAS, G. M. Síntese e caracterização do politereftalato de trimetileno. CBPOL - Congresso Brasileiro de Polímeros, 2011, Campos do Jordão - SP.

FERREIRA, F. G. D.; ALMEIDA, Y. M. B.; VINHAS, G. M.; LIMA, M. A. G. A. PEREIRA, R. F. C. Conversão microbiológica do glicerol a 1,3-propanodiol pelo *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. In: XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2010, Foz do Iguaçu, PR, **Anais...** Foz do Iguaçu, PR: ABEQ, 2010. CD ROM.

FERREIRA, F. G. D.; Vinhas, G. M.; LIMA, M. A. G. A.; ALMEIDA, Y. M. B. BEZERRA, V. C. R.; MORAES, C. M. Avaliação da pré-cultura na produção do 1,3-propanodiol pelo *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 a partir da fermentação do glicerol. In: 50º Congresso Brasileiro de Química, 2010, Cuiabá, MS. **Resumo expandido.** Cuiabá, MS: 2010.